

Posada en funcionament d'un equip d'anàlisi d'imatges hiperespectrals a l'infraroig proper (HSI-NIR) per la discriminació de mostres de blat contaminades amb deoxinivalenol



TREBALL FINAL DE MÀSTER

Alumne: Víctor Martín Ruiz

Tutora: Dra. Sonia Marin Sillue

Cotutor: Dr. Antonio J. Ramos Girona

Màster en Gestió i Innovació en la Indústria Alimentària (MGIIA)

Octubre de 2018



Máster en Gestión e
Innovación en la
Industria Alimentaria



Universitat de Lleida

Resum

Català: En aquest treball final de màster s'ha posat a prova el HSI-NIR per determinar la seva capacitat per detectar deoxinivalenol (DON) en mostres de blat i s'ha deduït que no només és possible sinó que a més es pot fer amb bons resultats. Els models de predicció creats mitjançant PLS permeten predir la concentració de DON en una mostra a partir de l'espectre obtingut amb l'equip HSI-NIR. El millor model creat correspon a l'obtingut amb les mostres de blat mòlt, que té una pendent de 0,94, una ordenada a l'origen de 2,63, un RMSEP de 210,21 ppb i un R^2 de 0,95. En quant al model obtingut a partir de les mostres de blat naturalment contaminat, el millor model té una pendent de 0,91, una ordenada a l'origen de 32,44, un RMSEP de 423,36 ppb, i un R^2 de 0,81. Els paràmetres de tots dos models són molt bons i així es demostra que aquests models permeten predir la concentració de DON amb certa precisió. A més de la predicció de DON, el HSI-NIR també ens permet classificar les mostres segons el nivell de DON o segons si superen un llindar específic amb una concordança superior al 90%.

Castellà: En este trabajo final de máster se ha puesto a prueba el HSI-NIR para determinar su capacidad para detectar deoxinivalenol (DON) en muestras de trigo y se ha deducido que no solamente es posible sino que además se puede hacer con buenos resultados. Los modelos de predicción creados mediante PLS permiten predecir la concentración de DON en una muestra a partir del espectro obtenido con el equipo HSI-NIR. El mejor modelo creado corresponde al obtenido con las muestras de trigo molido, que tiene una pendiente de 0,94, una ordenada en el origen de 2,63, un RMSEP de 210,21 ppb y un R^2 de 0,95. En cuanto al modelo obtenido a partir de las muestras de trigo naturalmente contaminado, el mejor modelo tiene una pendiente de 0,91, una ordenada en el origen de 32,44, un RMSEP de 423,36 ppb, y un R^2 de 0,81. Los parámetros de los dos modelos son muy buenos y de esta manera se demuestra que estos modelos permiten predecir la concentración de DON con cierta precisión. Además de la predicción de DON, el HSI-NIR también permite clasificar las muestras según el nivel de DON o según si superan o no un umbral específico con una concordancia superior al 90%.

Anglès: In this master final project the HSI-NIR has been tested to determine its ability to detect deoxynivalenol (DON) in samples of wheat and it has been deduced that it is not only possible but also that it can be done with good results. Prediction models created using PLS allow predicting the concentration of DON in a sample from the spectrum obtained with the HSI-NIR equipment. The best model created corresponds to that obtained with samples of ground wheat, having a slope of 0.94, an offset of 2.63, a RMSEP of 210.21 ppb, and a R^2 of 0.95. As for the model obtained from naturally contaminated wheat samples, the best model has a slope of 0.91, an offset of 32.44, a RMSEP of 423.36 ppb, and a R^2 of 0.81. The parameters of both models are very good and thus it is shown that these models allow predicting the concentration of DON with some accuracy. In addition to the DON prediction, the HSI-NIR also allows us to classify samples according to the DON level or according to whether they exceed a specific threshold with an accuracy greater than 90%.

Índex

1. Introducció	4
1.1. Micotoxines	4
1.2. Deoxinivalenol (DON)	5
1.3. Gestió de la seguretat alimentària aplicada al DON	14
1.4. Impacte del processat al DON	17
1.5. Mètodes habituals d'anàlisi a entrada a fàbriques	18
1.6. Tècniques NIR per la detecció de grans contaminats per <i>Fusarium</i> o per DON	19
2. Objectius	21
3. Metodologia	22
3.1. Introducció a l'equip HSI-NIR	22
3.2. Protocol de treball amb l'equip d'anàlisi hiperespectral	23
3.3. Cerca de materials contaminats.....	28
3.4. Variables que poden afectar a les lectures de reflectància	32
3.5. Tractament estadístic de les dades i avaluació de la possibilitat de discriminació	35
4. Resultats i discussió.....	37
4.1. Contaminació per DON en les mostres analitzades	37
4.2. Variables que poden afectar a les lectures de reflectància	40
4.3. Capacitat del sistema HSI-NIR per determinar el nivell de DON en mostres de blat..	47
5. Conclusions.....	63
6. Bibliografia	65
7. Annex	70

1. Introducció

1.1. Micotoxines

Les micotoxines són metabòlits secundaris tòxics produïts de forma natural per organismes del regne Fungi, les quals es consideren perilloses quan estan presents tant en alimentació humana com animal (Barbedo et al., 2017). Aquest terme s'utilitza gairebé exclusivament per denominar les toxines produïdes per fongs associats a productes alimentaris i alimentació animal, però queden excloses les toxines que són produïdes per bolets. Són uns metabòlits secundaris dels quals encara no es coneix exactament quin és el seu paper. La seva producció es duu a terme principalment quan el fong arriba a l'etapa de maduresa. L'estructura molecular pot variar des d'anells heterocíclics simples amb pes molecular de fins a 50 Da, a grups de 6-8 anells heterocíclics irregulars que poden superar els 500 Da (Rocha et al., 2014).

Es poden trobar en productes alimentaris com cereals i fruits secs (Rocha et al., 2014). La contaminació pot produir-se en varies etapes com la pre-collita, post-collita o també durant el processament i emmagatzematge (Sforza et al., 2006). Les toxines poden entrar a la cadena alimentària mitjançant una contaminació directa o indirecta. La contaminació directa succeeix quan el producte en sí és contaminat per un fong toxigènic i aquest produeix la toxina. La forma indirecta es duu a terme quan qualsevol ingredient ha estat contaminat prèviament per un fong toxigènic. Tot i que s'hagi pogut eliminar aquest fong durant el processament, la micotoxina encara pot romandre fins arribar al producte final (Smith et al., 1995). Aquesta contaminació no és només un problema que es produeix en països en desenvolupament, sinó que afecta a una gran quantitat de països. Influeix negativament en l'agroindústria dificultant l'exportació, reduint la producció dels cultius agrícoles i del bestiar i també, en alguns països, afectant a la salut humana (Rocha et al., 2014).

Els principals fongs causants de contaminacions d'aliments per humans i animals per micotoxines pertanyen als gèneres *Aspergillus*, *Fusarium* i *Penicillium*. Mentre que les espècies d'*Aspergillus* i *Penicillium* creixen en els aliments principalment durant l'emmagatzematge, les de *Fusarium* poden infectar els cultius directament durant el seu creixement en el camp i es propaguen per les plantes (Alshannaq et al., 2017).

S'han identificat al voltant de 300 micotoxines, però només unes poques són les que regularment es troben contaminant els aliments. Aquestes són les aflatoxines, ocratoxines, fumonisines, patulina, zearalenona i tricotecens, que inclouen el deoxinivalenol (DON) i la toxina T-2 (Alshannaq et al., 2017).

1.2. Deoxinivalenol (DON)

El DON és un tipus de micotoxina que pertany al grup dels tricotecens tipus B que alhora forma part d'un grup major conegut com toxines de *Fusarium*.

Aquesta micotoxina és la que més freqüentment es troba en grans de cereals. De totes maneres en un principi el DON no constitueix una amenaça significativa per a la salut pública en països desenvolupats, gràcies al compliment de les legislacions en vigor. Afecta tant a humans com animals. En humans s'han registrat en alguns casos nàusees i vòmits a curt termini. Altres efectes inclouen diarrea, dolor abdominal, mal de cap, mareig i febre (Sobrova et al., 2010). En animals, en ingerir-la en elevades dosis, també causa nàusees, vòmits i diarrees. En ingerir-la en dosis més baixes pateixen una reducció del pes corporal i un rebuig al menjar. Degut a aquests símptomes, el DON també es coneix per vomitoxina (Rocha et al., 2014).

Químicament el DON és un compost orgànic polar (Figura 1) (Sobrova et al., 2010). El seu nom químic és 12,13-epoxy-3 α ,7 α ,15-trihydroxytrichotech-9-en-8-on (Nagy et al., 2005). La seva toxicitat està associada a que la seva molècula conté 3 grups hidroxils lliures (-OH). Una propietat a destacar del DON és la capacitat per suportar elevades temperatures. Per això és

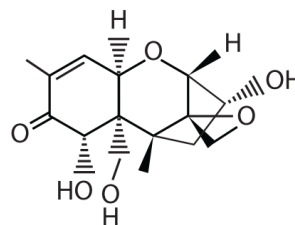


Figura 1. Estructura química del deoxinivalenol (Sobrova et al., 2010).

perillosa la seva presència en matèries primeres, ja que degut a aquesta propietat pot suportar la cocció de l'aliment i inclús temperatures d'esterilització (Hughes et al., 1999), havent demostrat ser molt estable entre temperatures de 170 a 350 °C, sense reduir la seva concentració estant 30 min a 170 °C (Taula 1) (Sobrova et al., 2010). No obstant, sí que s'ha pogut veure reducció de la concentració de DON en pasta cuinada. Aquesta reducció no és deguda a la temperatura, sinó a la seva solubilització en l'aigua de cocció, però no hi ha destrucció (Visconti et al., 2004). A més, es va veure que els nivells de DON no disminueixen al fregir amb oli algun aliment contaminat (Kushiro, 2008).

Taula 1 Propietats físico-químiques del deoxinivalenol (Sobrova et al., 2010).

Propietat	Informació
Nom	Deoxinivalenol (DON), vomitoxina
Nom IUPAC	12,13-epoxy-3 α ,7 α ,15-trihydroxytrichotech-9-en-8-on
Formula molecular	H ₁₅ O ₂₀ O ₆
Massa molar	296.32 g/mol
Estat físic	Agulles fines incolores

Punt d'ebullició (°C)	543.9±50.0 °C
Punt de fusió (°C)	151-153 °C
Punt de flama (°C)	206.9±2.5 °C
Pressió de vapor (Torr)	4.26×10^{-14} 25 °C
Soluble en:	Solvents polars orgànics (metanol aquós, etanol, cloroform, acetonitril, acetat d'etil) i aigua

Principalment és produïda per *Fusarium graminearum*, que és un dels fongs més comuns mundialment associats amb els grans en el camp. Aquest patogen causa el Fusarium head blight (FHB). Els típics símptomes són el descoloriment i l'arrugament dels grans (Parry et al., 1995) i també la disminució del pes (Su et al. 2018). El FHB és un dels desordres més importants que afecta al blat de tot el món i és responsable de grans reduccions en el rendiment (40-60%) i qualitat del gra i a part d'això, tal i com s'ha comentat, *F. graminearum* produeix la micotoxina DON que és nociva tant pels animals com pels humans (Mendes et al., 2018; Schöneberg et al., 2018).

Igual que passa amb altres toxines produïdes per *Fusarium* com són la zearalenona (ZEN) i les fumonisines, les condicions climàtiques durant el creixement del fong tenen una gran influència en la producció del DON. La incidència de FHB és major quan hi ha precipitacions durant l'etapa de floració, però el contingut en DON no sempre està correlacionat amb el grau de severitat d'aquesta malaltia (Mendes et al., 2018).

Espècies productores

La producció de DON no és deguda només a una espècie, sinó a varies. El principal fong productor de DON és *F. graminearum*, seguit per altres *Fusarium* com *F. culmorum* o *F. cerealis* (Marin et al., 2013). N'hi ha més, encara que tenen menys rellevància, com *F. sporotrichioides* (Heidtmann-Bemvenuti, 2011), *F. pseudograminearum*, (Frisvad et al., 2006), *F. poae* (Chrpová et al., 2016), *F. acuminatum* (Marin et al. 2012), *F. avenaceum* (De Nijs et al., 1996), *F. equiseti* (McLachlan et al., 1992), *F. nivale* (De Nijs et al., 1996), *F. roseum* (Miller et al., 1983), *F. sambucinum* (El-Banna et al., 1984), *F. semitectum* (Lauren et al. 1988), i *F. solani* (El-Banna et al., 1984).

Per *F. graminearum* les condicions òptimes pel seu creixement en gra de blat són de 25 °C amb una activitat d'aigua de 0,99 a_w , i de 15 °C quan l'activitat d'aigua és 0,98 a_w (Hope et al., 2005).

En canvi, el seu creixement òptim en soja és duu a terme entre temperatures de 15 i 20 °C i una activitat d'aigua de 0,99 a_w (Garcia et al., 2012).

Pel que fa a la producció de DON, *F. graminearum* necessita en gra de blat les condicions inverses que pel seu creixement òptim. És a dir, 15 °C i 0,99 a_w o 25 °C i 0,98 a_w (Hope et al., 2005). En soja en canvi la temperatura òptima per la producció de DON es troba als 20 °C i 0,99 a_w (Garcia et al., 2012).

En quant a *F. culmorum* el seu creixement òptim en gra de blat es produeix quan té una activitat d'aigua de 0,98 a_w i una temperatura d'entre 15 i 25 °C. L'activitat d'aigua mínima pel seu creixement és 0,90 a_w (Hope et al., 2005).

No obstant les seves condicions òptimes de producció de DON en blat tenen un rang molt més estret. L'activitat d'aigua i la temperatura han de ser de 0,97 a_w a 15 °C i de 0,99 a_w a 25 °C (Hope et al., 2005).

Efectes toxicològics

El DON suposa un perill tant per a humans com per a animals, ja que pot interferir en el funcionament normal de la cèl·lula eucariota inhibint la síntesi de proteïnes (Barbedo et al., 2017). L'impacte del DON en la salut humana es pot produir després d'ingerir aliments contaminats com per exemple la civada, l'ordi, el blat, el panís o altres cereals. També s'ha detectat DON en blat sarraí, sorgo, crispetes, farina, pa, fideus, cervesa, malta i altres aliments per al consum humà. A més, els animals que han estat exposats al DON transfereixen aquesta toxina als productes animals. Tot i així la taxa de transmissió és baixa (Sobrova et al., 2010).

Toxicitat aguda

Tot i que el DON es tracta d'una micotoxina menys tòxica que altres tricotecens, com la toxina T-2, dosis molt elevades poden provocar igualment la mort. No obstant, aquestes dosis tan elevades es plantegen molt poc probables en aliments (Sobrova et al., 2010).

La LD₅₀ per ratolins es troba en un rang de entre 49 i 70 mg/kg quan s'administra mitjançant una injecció intraperitoneal. De 46 a 78 mg/kg és quan l'administració és oral. Per ànecs de 10 dies la LD₅₀ és de 27 mg/kg quan s'administra per via subcutània i de 140 mg/kg per pollets d'un dia amb administració oral (Sobrova et al., 2010).

Els símptomes de la toxicitat aguda de DON són malestar abdominal, augment salival, diarrea, malestar general, vòmits i anorèxia. Tot i ser un dels tricotecens menys letal, mostra un elevat potencial emètic i anorèxic. La mínima dosi emètica per via intraperitoneal és de 50 µg/kg de

pes corporal en porc amb un NOAEL (Dosi sense efecte advers observable, acrònim de *No Observed Adverse Effect Level*) de 25 µg/kg de pes corporal. Quan es tracta de via oral, la dosi mínima emètica és de 100 µg/kg de pes corporal també en porc i un NOAEL de 75 µg/kg de pes corporal (Forsyth et al., 1977). No obstant, altres estudis afirmen que la mínima dosi emètica tant per via intraperitoneal com oral és de 50 µg/kg de pes corporal en porc amb un NOAEL de 25 µg/kg de pes corporal (Pestka et al., 1987; Pestka, 2007; Sobrova et al., 2010).

Exposició a curt termini i subcrònica

Estudis mostren que l'exposició subcrònica i a curt termini a DON provoca una disminució del pes corporal, del guany de pes i del consum d'aliments tant per part de rates com ratolins. En alguns estudis es demostra que aquesta exposició també arriba a provocar efectes hematològics. S'afirma que el DON provoca l'augment de pes d'òrgans com la melsa i el fetge així com també les proporcions entre el pes del fetge i dels ronyons front el pes corporal (Pestka, 2007). No obstant, altres estudis afirmen que el DON no provoca cap alteració en el pes de cap òrgan (Gouze et al., 2006). El DON també indueix lesions a l'estómac no glandular, causa una depleció limfàtica del timus, i un augment de les incidències i la severitat de la hematopoesis esplènica (Sprando et al., 2005).

Toxicitat crònica

En ratolins alimentats durant 16 setmanes amb dietes experimentals que contenen DON (20 mg/kg), es va veure una reducció en el consum mitjà diari d'aliments, en el guany mitjà de pes corporal i en el pes corporal total. També s'observa un augment de la immunoglobulina A sèrica (IgA) (Iverson et al., 1995).

Citotoxicitat

En els timòcits de ratolins, el DON provoca augments significatius en les taxes apoptòtiques de forma dosis-dependent. També s'observa una disminució en els índex de proliferació de les cèl·lules tractades (Kolf-Clauw et al., 2009).

Efectes reproductius i teratològics

En ratolins femelles una injecció intraperitoneal de DON durant la gestació pot provocar morts maternals depenent de la dosi. En els embrions s'observen anomalies esquelètiques. Es pot produir exencefàlia depenent del tractament. A la dosi més alta i el període d'exposició més curt, es van detectar, principalment, defectes d'arc neuronal o fusió. Els cossos vertebrals mostren

diverses deformitats, hemivèrtebres i anomalies en les costelles i cervicals (Debouck et al., 2001).

Carcinogenicitat

L' Agència Internacional de Recerca sobre el Càncer (IARC, *International Agency for Research on Cancer*) considera que no hi ha prou evidències experimentals en animals per la carcinogenicitat del DON. El DON està situat en el Grup 3 de carcinogenicitat, que significa que no és classificable pel que fa a la seva carcinogenicitat per als éssers humans. Els estudis realitzats en ratolins demostren que l'administració diària de DON no augmenta la incidència de neoplàsia ni en mascles ni femelles (Iverson et al., 1995).

Genotoxicitat

S'ha observat que en hàsters la ingesta de DON provoca aberracions cromàtiques, principalment trencaments cromàtics. També produeixen dany al DNA de cèl·lules Vero. Les incubacions a curt termini principalment incrementen el nombre de fragments de DNA mentre que incubacions més llargues causa principalment fragments de DNA de mida petita (Sun et al., 2002; Sobrova et al., 2010).

Immunotoxicitat

El DON és immunoestimulador i immunosupresor segons la dosi i la freqüència d'exposició. Provoca alteracions en la resistència de l'individu afectat i en les respostes humoral i mediades per cèl·lules. També alteració dels nivells de IgA sèrics, nefropatia associada a IgA, expressió de citoquina i apoptosi en el teixit limfoide (Sobrova et al., 2010).

Cereals afectats , estudis d'incidència i d'exposició de la població

L'exposició a DON es generalitza al voltant de països amb climes temperats, com per exemple en els països mediterranis. En aquestes condicions els fongs productors de DON creixen i contaminen amb facilitat, però és que a més es tracta d'una zona amb un gran cultiu i consum de cereals, que és el millor substrat per aquests fongs (Marin et al., 2013). Els cereals tenen un paper molt important dins de la dieta. Diàriament es consumeixen cereals, en els quals és comú detectar DON, com arròs, blat, panís, mill, blat sarraí, arròs negre, civada, ordi, sorgo i d'altres. A més, aquests cereals també es processen per formar farines, pans, pasta i altres productes alimentaris que es consumeixen diàriament (Ji et al., 2018). Per tant, queda clar que els humans estem exposats al DON i les micotoxines en general en la nostra dieta. La presència de

micotoxines en la nostra alimentació i sobretot en la dieta de la població més vulnerable com els infants, és un motiu de preocupació (Castillo et al., 2008).

S'han realitzat nombrosos estudis per tal de determinar el percentatge d'incidència en els diferents cereals i productes així com també entre els diferents països o continents.

A nivell europeu el cereal que presenta un major percentatge (Taula 2) de mostres positives és el panís o blat de moro (89%), seguit pel blat i farina de blat (61%). També és el panís el que té una concentració mitjana (594 µg/kg) i una concentració màxima (8850 µg/kg) més elevades. La gran diferència entre la concentració mitjana i la concentració màxima ens dóna a entendre que els casos amb concentracions molt elevades són casos puntuals. Tot i que els percentatges de mostres positives pot semblar força elevat, s'ha de tenir en compte que de totes les mostres que donen resultats positius, només una baixa proporció arriben a superar els llindars establerts per la UE mitjançant els límits de concentracions màximes (Marin et al., 2013).

Taula 2. Incidència de DON en mostres d'aliments en la Unió Europea (Marin et al., 2013).

Categoria d'aliment	Mostres positives (%)	Concentració mitjana (µg/kg)	Concentració màxima (µg/kg)
Blat i farina de blat	61	205	3600
Ordi	47	37	550
Civada	34	95	5004
Sègol i farina de sègol	50	42	595
Panís	89	594	8850
Galetes	24	60,6	420
Pa	32	88,9	560
Pasta	56	141,2	3200
Cereals d'esmorzar	56	198,8	426
Alimentació infantil	72	99,6	1075

En un estudi a Croàcia, per exemple, la incidència de DON en cereals després de collir també és major en el panís (Taula 3). La concentració mitjana i màxima també és molt superior als altres cereals (Pleadin et al., 2013).

Taula 3. Incidència de DON en mostres de cereals a Croàcia (Pleadin et al., 2013).

Categoria d'aliment	Mostres positives (%)	Concentració mitjana (µg/kg)	Concentració màxima (µg/kg)
Panís	71	1565	2942
Blat	65	223	278

Ordi	53	342	—
Civada	21	145	201

Un altre estudi (Taula 4) va demostrar que la incidència de DON en alimentació d'animals de granges a Suècia és molt elevada en civada, ordi i blat; en aquest estudi no es va analitzar panís. El cereal que més incidència mostra és la civada (96%) seguida pel blat (90%) i l'ordi (88%). Es tracta d'una incidència molt elevada. En quant a les concentracions mitjanes i màximes, la civada és la que presenta una major concentració amb diferència (Nordkvist et al., 2014).

Taula 4. Incidència de DON en mostres de cereals per pinsos a Suècia (Nordkvist et al., 2014).

Categoria d'aliment	Mostres positives (%)	Concentració mitjana (µg/kg)	Concentració màxima (µg/kg)
Civada	96	2123	21613
Ordi	88	321	1729
Blat	90	551	3230

També s'han fet estudis d'incidència de DON en productes comercialitzats a Espanya basats en blat, arròs i panís (Taula 5). En aquest cas clarament els que més contaminació presenten són els productes basats en blat (79,8%) tot i que es troben en concentracions molt inferiors en comparació als estudis anteriors. En aquest cas és lògic que la concentració sigui menor ja que estem parlant de producte acabat (Rodríguez-Carrasco et al., 2013).

Taula 5. Incidència de DON en mostres de productes basats en cereals a Espanya (Rodríguez-Carrasco et al., 2013).

Categoria d'aliment	Mostres positives (%)	Concentració mitjana (µg/kg)	Concentració màxima (µg/kg)
Derivats de blat	79,8	15,67	83,2
Derivats d'arròs	13	5,02	5,5
Derivats de panís	35,3	8,5	22,1

En el cas de productes comercialitzats en supermercats de Catalunya (Taula 6), el producte que més incidència mostra és el pa amb un 100% de mostres positives. Després ve seguit per snacks de panís (78,9%), pasta (74,3%), flocs de blat (74,1%) i flocs de panís (75,4%) que tenen uns percentatges molt similars. Amb molta diferència estan després el pa de motlle (16,7%), el panís dolç (2,8%) i la cervesa (1,4%). En quant a les concentracions, el producte que té una concentració mitjana major és el pa, que pot ser preocupant ja que a més mostrava un 100% de mostres positives. La segona concentració mitjana més elevada correspon a la pasta que també

té una incidència molt elevada (74,3%). En quant a les concentracions màximes, la pasta és la que major concentració presenta seguida pel pa (Cano-Sancho et al., 2011).

Taula 6. Incidència de DON en productes alimentaris basats en cereals a Catalunya (Cano-Sancho et al., 2011).

Categoria d'aliment	Mostres positives (%)	Concentració mitjana (µg/kg)	Concentració màxima (µg/kg)
Flocs de blat	74,1	190	437
Flocs de panís	75,4	109	580
Cervesa	1,4	12	12
Panís dolç	2,8	114	139
Snacks de panís	78,9	153	304
Pasta	74,3	226	946
Pa de motlle	16,7	68	98
Pa	100	246	739

A més d'aquests estudis d'incidència també se n'han fet d'exposició de la població per tal d'aproximar-se al risc de toxicitat aguda o crònica que pot patir la població. La ingesta diària admissible (TDI, *Tolerable Daily Intake*) per DON és de 1 µg/kg de pes corporal al dia. Si es supera aquest límit estaríem incrementant el risc de patir una toxicitat crònica deguda a DON. En canvi la dosi aguda de referència (ARfD, *Acute Reference Dose*) és de 8 µg/kg de pes corporal (EFSA, 2013).

Un estudi detalla l'exposició a DON de diferents grups poblacionals dins de la Unió Europea (Taula 7).

Taula 7. Exposició a DON de diferents grups poblacionals dins la Unió Europea (EFSA, 2013).

Grup Poblacional	Interval Ingesta Diària (µg/kg pes corporal)	Percentatge de TDI (1 µg/kg pes corporal)(%)
Bebès (< 1 any)	0,16-0,73	16-73
Nens entre 1 i 2 anys	0,48-1,02	48-102
Nens entre 3 i 9 anys	0,43-0,97	43-97
Adolescents (≥ 10 i < 18 anys)	0,28-0,58	28-58
Adults (≥ 18 i < 65 anys)	0,17-0,46	17-46
Ancians (≥ 65 i < 75 anys)	0,16-0,31	16-31
Molt Ancians (≥ 75 anys)	0,21-0,33	21-33

En quant a l'exposició a toxicitat crònica, els grups que més poden estar exposats són els nens entre 1 i 2 anys i també els nens entre 3 i 9 anys. El grup de nens entre 3 i 9 anys en els nivells

més elevats gairebé arribaria a la dosi diària admissible. Fins i tot els nens entre 1 i 2 anys podrien arribar a superar aquesta dosi diària admissible. A mesura que el grup poblacional és d'edat més avançada, aquest risc va disminuint (EFSA, 2013).

Si bé la toxicitat crònica en algun grup poblacional podria suposar un risc, pel que fa a l'exposició a toxicitat aguda el risc és molt baix. El grup poblacional que té un major percentatge (Taula 8) és el de nens entre 3 i 9 anys amb un 1,37% seguit dels nens entre 1 i 2 anys amb un 0,72%. Això vol dir que de tots els individus estudiats pràcticament ni un ha arribat a superar almenys un dia el límit establert per la ARfD (EFSA, 2013).

Taula 8. Exposició de diferents grups poblacionals amb almenys un dia per damunt de la ARfD a la Unió Europea (EFSA, 2013).

Grup Poblacional	Percentatge d'individus amb almenys un dia d'exposició per damunt de la ARfD (8 µg/kg pes corporal)(%)
Bebès (< 1 any)	0,08-0,38
Nens entre 1 i 2 anys	0,19-0,72
Nens entre 3 i 9 anys	0,13-1,37
Adolescents	0,03-0,46
Adults	0,01-0,23
Ancians	0-0,09
Molt Ancians	0-0,11

Legislació

Degut a l'elevada presència de DON en els cereals i la gran exposició de la població a aquest contaminant, la Comissió Europea (CE) va establir uns límits màxims permesos de DON en diferents productes alimentaris. Depenent de quin tipus de cereal, grau de processament o producte es tracta, el límit acordat és un o un altre. Segons el "Reglamento (CE) Nº 1881/2006 de la Comisión, de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios" els límits de DON establerts per determinants productes alimentaris són els següents (Taula 9):

Taula 9. Límits de DON establerts per determinants productes alimentaris (Comissió Europea, 2006b)

Producte Alimentari	Contingut Màxim (µg/kg)
Cereals no elaborats que no siguin blat dur, civada i panís	1250
Blat dur i civada no elaborats	1750
Panís no elaborat	1750

Cereals destinats al consum humà directe, farina de cereals (inclosa la farina de panís, i el panís triturat i mòlt), segó com producte final comercialitzat pel consum humà directe i germen	750
Pasta (seca)	750
Pa (inclòs petits productes de fleca), pastissos, galetes, aperitius de cereals i cereals per esmorzar	500
Aliments elaborats a base de cereals i aliments infantils per lactants i nens de curta edat	200

El reglament diferencia els continguts màxims depenent de si els cereals estan o no elaborats. Apunta que l'arròs no està inclòs dins dels "cereals" i que els productes a base d'arròs no s'inclouen dins de "productes a base de cereals".

Quan es parla de cereals no elaborats vol dir que el contingut màxim que s'aplica és per cereals no elaborats comercialitzats per una primera fase de transformació. Una primera fase de transformació es refereix a qualsevol tractament físic o tèrmic (excepte l'assecat) al que sigui sotmès el gra o la seva superfície. Els processos de neteja, classificació i assecat no es consideren inclosos en la primera fase de transformació sempre i quant no s'exerceixi cap acció física sobre el gra en sí i el gra sencer romangui intacte després de la neteja i classificació.

En els cereals destinats al consum humà no estan inclosos els que estan destintats a població infantil, que tenen un límit més estricte: 200 µg/kg.

La pasta seca es refereix a la pasta que té un contingut d'aigua d'aproximadament el 12%.

1.3. Gestió de la seguretat alimentària aplicada al DON

Degut a la dificultat d'eliminar el DON dels aliments un cop ja estan contaminats a causa de la seva elevada estabilitat, la mesura de gestió més important per tal de reduir la seva presència en aliments i la exposició humana és l'aplicació de unes bones pràctiques d'higiene. Per tal de reduir la incidència d'aquestes micotoxines en els cereals s'han de dur a terme unes bones pràctiques agrícoles (BPA) com a primera línia de defensa contra la contaminació i després com a segona línia de defensa unes bones pràctiques de fabricació (BPF) durant la manipulació, emmagatzematge i distribució dels cereals. A més, també considerar el DON i altres micotoxines dins del sistema d'Anàlisi de Perills i de Punts de Control Crítics (APPCC). Per tal d'ajudar en la

gestió d'aquest perill, s'han creat unes recomanacions per la prevenció i la reducció d'algunes micotoxines que inclouen el DON (Comissió Europea, 2006a; Codex Alimentarius, 2016).

En la fase que va des de la sembra del cultiu fins el transport de la collita, és important aplicar unes bones pràctiques agrícoles per tal de reduir els factors de risc i aleshores prevenir la contaminació dels cereals cultivats. Les pràctiques més importants són: la rotació dels cultius, l'elecció de la varietat o híbrid, la planificació dels cultius (bones condicions meteorològiques), la gestió dels sòls, l'ús precís dels fungicides, la collita, l'assecat, l'emmagatzematge i el transport (Comissió Europea, 2006a).

La rotació de cultius és una manera eficaç de reduir el risc de contaminació. Per minimitzar la possible contaminació s'ha de reduir l'inòcul en el camp. Per fer això s'haurien d'utilitzar en les rotacions cultius que no siguin hostes d'espècies de *Fusarium* com per exemple patates, hortalisses, etc. S'ha demostrat que en cultius de blat on en la rotació anterior hi havia un cultiu hoste de *Fusarium* tal com panís o altres cereals, els nivells de DON eren més elevats (Comissió Europea, 2006a).

És important elegir els híbrids o varietats que siguin més adequades per les condicions del sòl i climàtiques i també per les pràctiques agronòmiques habituals. Amb una correcta elecció es pot reduir l'estrès causat a les plantes i aleshores una reducció de la sensibilitat a patir micosis. També es pot elegir varietats de llavors que tinguin la capacitat de resistir infeccions per fongs i plagues d'insectes (Comissió Europea, 2006a).

Sempre que es pugui, s'hauria de planificar el cultiu per tal d'evitar unes condicions climàtiques que prolonguin la maduració en el camp. Un altre factor a tenir en compte és la sequera, que és un factor de risc per la infecció de *Fusarium* (Comissió Europea, 2006a). També evitar l'acumulació de plantes mantenint les distàncies entre plantes i fileres recomanades (Codex Alimentarius, 2016).

És recomanable analitzar el sòl per determinar la necessitat o no de fertilitzants o altres per garantir un correcte pH del sòl, així com una adequada nutrició de les plantes per evitar condicions adverses (Codex Alimentarius, 2016).

La gestió del sòl i del cultiu és un altre aspecte important a tenir en compte. Llaurar el sòl pot afavorir la destrucció o soterrament de residus de cultius infectats i d'aquesta manera reduir l'inòcul de *Fusarium*. A més afavoreix la infiltració de l'aigua en la terra i es minimitza l'erosió del sòl i nutrients (Comissió Europea, 2006a).

S'ha d'evitar dins de lo possible l'estrès vegetal (sequera, fred, carència de nutrients, etc.). Algunes mesures per evitar l'estrès vegetal poden ser el reg, subministrament òptim de nutrients essencials, etc. (Comissió Europea, 2006a).

S'ha de reduir al màxim els danys provocats per insectes i per infeccions fúngiques pròximes al cultiu mitjançant un ús adequat de fungicides i insecticides registrats i altres pràctiques (Codex Alimentarius, 2016).

Una alta densitat de males herbes incrementa la infecció per *Fusarium*. Per tant el control de les males herbes s'ha d'efectuar mitjançant mètodes mecànics, amb herbicides registrats o amb altres pràctiques segures i adequades (Comissió Europea, 2006a; Codex Alimentarius, 2016).

El gra enllitat té un efecte significatiu sobre els nivells de toxina, per tant s'ha d'evitar collir el gra enllitat, sobre tot si aquest es troba humit. Es pot disminuir l'enllitat ajustant les quantitats de llavors, utilitzant correctament fertilitzants i aplicant reguladors de creixement (Comissió Europea, 2006a).

Abans de començar la collita és important avaluar la qualitat del gra tenint en compte les limitacions d'un mostreig representatiu i d'un anàlisi ràpid *in situ*. El contingut d'humitat ha de ser el més adequat possible per tal d'evitar o disminuir la probabilitat de contaminació. En quant als equips de collita, s'ha d'assegurar que funciona correctament i les condicions d'higiene són bones ja que sinó es poden produir danys en el cereal i contaminacions (Comissió Europea, 2006a).

És essencial determinar el més representativament possible la humitat dels grans ja que d'aquesta forma es decidirà quan i quant assecar els grans abans de l'emmagatzematge. Com menys temps hi hagi entre la collita i l'assecat millor. Els nivells d'humitat dels grans han de ser inferiors als necessaris per afavorir el desenvolupament del fong durant l'emmagatzematge. Es calcula que per tenir una activitat d'aigua inferior al 0,65 es necessita un contingut d'humitat inferior al 15% (Comissió Europea, 2006a). Un cop s'han assecat, els grans dels cereals hauran de netejar-se i seleccionar-se per eliminar aquells que estiguin danyats o immadurs i eliminar matèries estranyes (Codex Alimentarius, 2016).

Durant l'emmagatzematge s'ha de controlar a intervals regulars el seu contingut en humitat i temperatura. Un augment de la temperatura pot ser degut a proliferació microbiana o una infestació d'insectes. Els procediments de manteniment i neteja de les instal·lacions d'emmagatzematge han de ser els adequats per tal d'evitar la presència d'insectes i fongs. Pot

incloure l'ús d'insecticides o fungicides registrats i/o altres mètodes apropiats (Comissió Europea, 2006a).

El transport del cereal s'ha de fer en uns contenidors secs, nets i desinfectats, que no presentin cap creixement fúngic visible, insectes ni material contaminat. S'han de protegir els grans de la humitat utilitzant contenidors coberts o hermètics, o amb lones amb revestiment anti-humitat. També evitar fluctuacions de temperatura (Comissió Europea, 2006a).

A l'entrada a fàbrica s'ha de realitzar un mostreig el més representatiu possible i analitzar mitjançant equips d'anàlisi ràpids el contingut de DON per tal de determinar si el lot és acceptable o si pel contrari supera el límit crític. També és important que els cereals que arriben tingut un contingut d'humitat inferior al nivell segur, que informará sobre la possibilitat que hagi pogut créixer *Fusarium* i/o altres fongs i així sobre la producció de micotoxines. A més, dins del pla de control de proveïdors es faran periòdicament analítiques instrumentals o per tècniques més precises (FAO, 2002).

1.4. Impacte del processat al DON

L'acumulació de DON i micotoxines en camp sembla que, tot i els esforços per reduir-la, és inevitable. Per això és tan important conèixer l'efecte del processat de les matèries primes en l'estabilitat de DON i veure si d'aquesta manera és possible reduir el contingut. Estudis confirmen que l'estabilitat del DON es veu compromesa durant diverses etapes de processat com poden ser la mòlta, fermentació i cocció. També sembla que l'ús d'ozó, tot i que no és permès a la UE, pot ajudar a la reducció de DON (Vidal et al., 2016).

Hi ha algunes altres etapes de processat que van abans del procés de mòlta, com la neteja, que poden reduir el DON entre un 6 i 19% o també el polit o l'abrasió fins a reduccions del 22% (Kushiro et al., 2008).

Durant el procés de mòlta del blat en realitat no s'està duent a terme una eliminació de DON sinó una redistribució. Això vol dir que el DON passa a concentrar-se en una fracció del blat molt i a disminuir en una altra. Favorablement pel consum humà, la fracció que redueix la seva contaminació és la de la farina o sèmola. En canvi la fracció que va majoritàriament destinada per consum animal (segó i altres) es veu perjudicada ja que s'observa un increment de la concentració (Vidal et al., 2016). La reducció de la concentració en farina o sèmola en comparació al gra sencer pot variar considerablement podent arribar a valors de 89% de reducció, tot i que és més comú trobar reduccions que es trobin entre el 50 i el 70% (Cheli et al., 2013). Tanmateix, en altres estudis es troben reduccions de entre 24-41% (Lee et al., 1987).

La reducció de DON durant el procés de fermentació de masses de farina de blat mostra certa controvèrsia. Això és perquè mentre en alguns casos s'ha aconseguit una reducció de la concentració de DON (Neira et al., 1997) en altres s'afirma que hi ha un increment (Vidal et al., 2014). Aquest diferent efecte de la fermentació en la concentració de DON s'atribueix a la presència o no d'enzims afegits. En afegir enzims es produeix un increment en la concentració, en canvi si no s'afegeix enzim i a més es fermenta a temperatures elevades sovint s'observen reduccions (Vidal et al., 2016).

L'etapa de cocció també mostra controvèrsia en quant a la reducció de DON. En alguns estudis no s'observa reducció (Vidal et al., 2014) en canvi en altres sí que es demostra una disminució de la concentració (Vidal et al., 2015). Aquests resultats contradictoris poden explicar-se per la mida i capacitat dels forns de cocció i també per la mida de les peces de pa (Vidal et al., 2016).

El tractament amb ozó demostra ser capaç de reduir la concentració de DON (Wang et al., 2016). S'ha demostrat unes reduccions de entre 3,5 i 26% depenent de la concentració d'ozó utilitzada (Li et al., 2015). Un aspecte força favorable d'aquest tractament és que aconsegueix reduir el DON sense causar un impacte negatiu ni física ni bioquímicament, per tant no disminueix la qualitat del blat (Vidal et al., 2016).

1.5. Mètodes habituals d'anàlisi a entrada a fàbriques

Quan el gra ha d'entrar a fàbrica es necessiten fer mostres i anàlisis per tal de determinar si la matèria prima que arriba compleix amb els nivells de concentració màxims permesos de micotoxines o no. Aquests anàlisis han de poder fer-se amb rapidesa per tal de poder obtenir uns resultats en poc temps i aleshores decidir si el gra és o no acceptat. Per tant, es necessiten realitzar proves mitjançant uns mètodes d'anàlisi ràpids que permetin monitoritzar les micotoxines en els aliments. Generalment es tracten de tests qualitius que demostren la presència o no de toxina, però també hi ha tests ràpids semi-quantitatius o quantitatius (Meneely et al., 2011).

A l'hora d'analitzar un lot de matèria prima sempre és important realitzar un bon mostreig per tal d'obtenir uns resultats que siguin representatius. Però aquest mostreig és encara més important realitzar-lo correctament quan es tracta d'analitzar micotoxines, ja que aquestes es troben distribuïdes de forma molt heterogènia i per tant si no es realitza un mostreig adequat els resultats obtinguts no seran representatius i aleshores no seran correctes. De fet, estudis demostren que la major font de variabilitat en els anàlisis de micotoxines és en primer lloc el mostreig, seguit pel submostreig i finalment l'anàlisi en sí (Whitaker et al., 2002).

La majoria de tècniques ràpides que s'utilitzen són mètodes immunoquímics com les tires immunocromatogràfiques (LFD, de l'anglès *lateral flow device*) o els assajos immunoenzimàtics (ELISA, de l'anglès *enzyme-linked immunosorbent assay*), però anys enrere també es van utilitzar altres com les cromatografies de capa fina. El test ELISA es tracta d'un dels més utilitzats tant en l'entrada a fàbrica com en laboratoris externs per fer les analítiques de comprovació al pla de control de proveïdors. La tècnica es basa en la unió específica entre antigen-anticòs, per tant és un mètode bastant específic i a més ràpid, simple i que permet quantificar. No obstant, el principal desavantatge és l'aparició de reactivitat creuada entre micotoxines del mateix grup o interferències amb la matriu. Un altre problema és que tot i que es tracta d'un mètode ràpid, la interacció toxina-anticòs necessita fins a dos hores per arribar a l'equilibri, encara que es poden trobar kits comercials que ho aconseguixin amb menor temps (Meneely et al., 2011).

A nivell d'entrada a fàbrica, el mètode més utilitzat és el de les tires reactives com les LFD. El principi d'aquest test és similar al de l'ELISA però adaptat a una tira. Principalment són assajos qualitius però també hi ha que permeten anàlisis semi-quantitatius i quantitatius. Els principals avantatges d'aquest mètode és la seva rapidesa (10 minuts), no requereix de ma d'obra qualificada, permet prendre decisions ràpidament i pràcticament a qualsevol lloc i a més és barat. La part negativa és que la precisió és més baixa comparat amb altres mètodes i que també pot haver reactivitat creuada (Meneely et al., 2011).

En general, els principals avantatges dels mètodes ràpids de monitorització són la velocitat, la simplicitat de la preparació de la mostra i el baix cost per anàlisi. Tot i així hi ha alguns desavantatges com per exemple la fiabilitat dels resultats, ja que poden haver falsos-positius. Es per això que per confirmar o comprovar els resultats s'utilitzen mètodes molt més precisos i fiables. Aquests mètodes inclouen anàlisis instrumentals com la cromatografia de gasos (GC) i sobretot la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC). Són tècniques que permeten obtenir resultats molt precisos i fiables però són molt més cares i requereixen de personal qualificat (Meneely et al., 2011).

1.6. Tècniques NIR per la detecció de grans contaminats per *Fusarium* o per DON

La tècnica NIR ja s'utilitza avui en dia per determinar nombroses qualitats tant físiques com químiques en aliments en general, però també en grans de cereals. Té nombroses aplicacions com, per exemple, la determinació de la humitat, proteïna, midó, greixos, etc. És una eina que funciona molt bé per determinar components majoritaris de les mostres. En quant a l'aplicació

de la tècnica NIR per detectar i predir els nivells de micotoxines en cereals, podria suposar un gran avenç ja que és un mètode molt ràpid i no destructiu que permetria discriminar entre cereals contaminats i no contaminats. No obstant, al pretendre detectar micotoxines, que es tracten de compostos presents en concentracions molt baixes, la tasca es complica més que per detectar els components majoritaris anteriorment esmentats.

Tot i així, el potencial d'aquesta tècnica és tan gran que actualment s'estan realitzant nombrosos estudis per tal d'aconseguir calibrar l'equip NIR i així ser capaços de detectar i predir la presència de micotoxines en els cereals. Peiris et al. (2009) van trobar diferències en l'alçada i posició d'alguns pics de l'espectre NIR entre grans contaminats per DON i sans. A 1204 nm, 1365 nm i 1700 nm les diferències es trobaven en les alçades dels pics. Aquestes diferències les atribueixen a canvis en els nivells de reserves dels grans com pot ser el midó, proteïnes o lípids. També van observar canvis en les posicions de pics de l'espectre NIR observats entre els 1425 – 1440 nm i 1915 – 1930 nm. Aquestes diferències poden sorgir d'altres compostos actius detectables pel NIR, que no són comuns entre els dos tipus de grans (Peiris et al., 2009). Shahin et al. (2012) van utilitzar PLS-DA (*Partial least squares discriminant analysis*) per discriminar entre grans sans i grans afectats per *Fusarium* mitjançant els espectres NIR. El model va ser capaç de detectar els grans afectats amb una exactitud del 90% (Shahin et al., 2012). Pettersson et al. (2003) introduint els espectres NIR en programari multivariant i utilitzant les eines PCA (*Principal Component Analysis*) i PLS (*Partial Least Square*) van determinar que utilitzant 11-13 PCs (Components Principals) és possible obtenir una correlació DON predit vs DON real de 0,984. Aquests resultats indiquen que és possible desenvolupar en un futur un model de calibratge que sigui capaç per monitoritzar les concentracions de DON en blat (Pettersson et al., 2003). Peiris et al. (2010) van aconseguir diferenciar gra a gra entre grans visualment sans i afectats per *Fusarium* mitjançant el sistema SKNIR (*Single Kernel Near-Infrared*) amb una exactitud del 98,9 i 99,9% respectivament. A més van classificar grans entre DON elevat (>60 ppm) i DON baix (<60 ppm) amb una precisió d'aproximadament 96% (Peiris et al., 2010).

Tot i els resultats obtinguts en diversos estudis, encara queda molt per investigar i estudiar sobre l'aplicació del NIR en la detecció de micotoxines. Podria arribar a suposar un gran avenç tant a nivell econòmic i de sostenibilitat com a nivell de seguretat alimentària, ja que en primer lloc, es podria evitar descartar lots de cereals sencers i només rebutjar els que realment estan altament contaminats i a més, permetria poder controlar amb molta més freqüència la qualitat dels cereals i evitar que puguin arribar al consum humà aliments excessivament contaminats.

2. Objectius

Aquest treball s'ha dut a terme a la Unitat de Micologia Aplicada del Departament de Tecnologia d'Aliments de la Universitat de Lleida on, coincidint amb la meua estada de pràctiques, s'ha realitzat la instal·lació de l'equip d'anàlisi hiperespectral objecte de l'estudi.

Els objectius del treball han estat els següents:

1. Desenvolupar un manual d'ús d'un equip d'anàlisi hiperespectral.
Descriure com preparar l'equip pas a pas per poder realitzar els escanejos i el funcionament de les principals eines necessàries pel projecte.
2. Posta a punt del sistema per la possible discriminació de mostres de blat contaminades per deoxinivalenol: Configurar tant l'equip (alçada de la càmera, llum, etc.) com el software (*framerate*, velocitat, etc.) per tal de poder predir el nivell de contaminació de les mostres, o bé discriminar aquelles que presentin nivells per sobre del límit màxim legal.

3. Metodologia

3.1. Introducció a l'equip HSI-NIR

L'equip es tracta d'una càmera de captura d'imatges hiperespectrals obtingudes en infraroig proper o *Near Infrared Hyperspectral Imaging* (HSI-NIR). El HSI-NIR és una tècnica que combina informació espectral i espacial per obtenir unes imatges hiperespectrals. Aquestes imatges tenen una matriu tridimensional ($x \times y \times \lambda$), essent x i y els eixos espacials i λ la informació espectral. L'equip funciona creant unes bandes bidimensionals amb multitud de píxels que ens aporten una visió espectral de la mostra i mitjançant la unió d'aquestes bandes formades al llarg de la mostra ens construeix una imatge espacial. Per tant, finalment tenim una imatge tridimensional amb informació espacial ($x \times y$) i també informació espectral (λ) per cada píxel de la imatge espacial. Aquesta imatge tridimensional és el que coneixem com a hipercub (Williams et al., 2012).

Exactament la càmera utilitzada en aquest projecte és una Pika NIR-320, de RESONON (Bozeman, MT, USA). Aquesta càmera té exactament la capacitat de captar 164 píxels per cada banda. El número de bandes s'assigna des del software en funció de la mida de la mostra o imatge que es vulgui captar. I l'interval de longitud d'ona en el que es treballa és entre 900 i 1700 nm. Per tant, quan escanegem el que estem és creant un hipercub de x (núm. bandes assignades) $\times y$ (164 píxels) $\times \lambda$ (900-1700 nm)(Figura 2)(Fox et al., 2014).

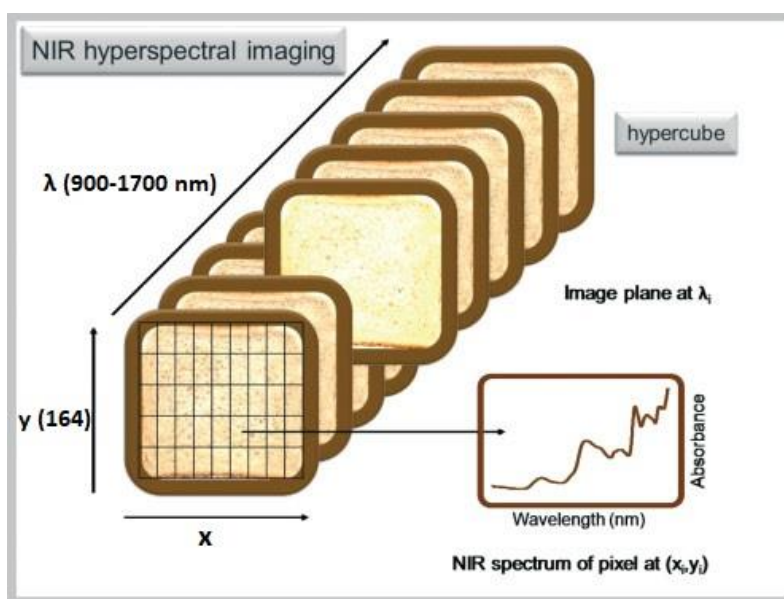


Figura 2. Esquema d'un hipercub obtingut per HSI-NIR. Fox et al. (2014)

L'equip està format per una càmera d'imatges hiperespectrals, una plataforma de translació lineal, una torre de muntatge, una unitat d'il·luminació i un ordinador amb el software instal·lat (Figura 3). El funcionament del sistema consisteix en la il·luminació de la mostra, aquesta llum es reflecteix en la mostra i ho capta la càmera, que fa passar la llum a través d'un prisma i aleshores dispersa la senyal per formar els components espectrals per cada píxel de la banda. La plataforma de translació mou la mostra i aleshores es van formant més bandes. La unió de totes aquestes bandes formen una imatge bidimensional que junt amb la informació espectral acaba formant l'hipercub tridimensional (McMullin et al., 2015).

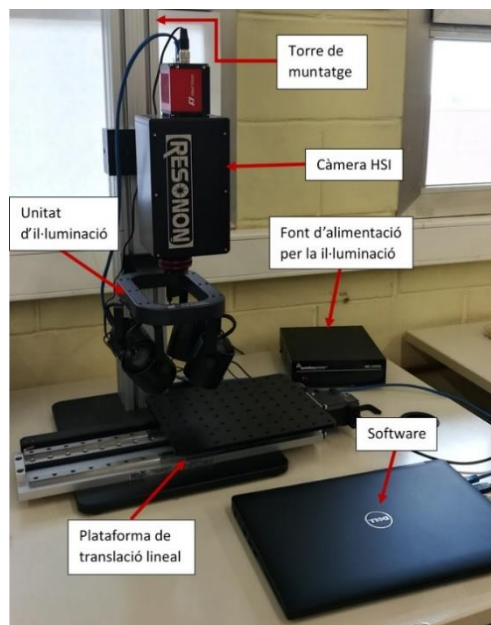


Figura 3. Parts de l'equip.

3.2. Protocol de treball amb l'equip d'anàlisi hiperespectral

L'equip permet manipular l'alçada tant de la càmera com del sistema d'il·luminació. L'alçada de la càmera principalment es determina depenent de la mida de la mostra. En el nostre projecte les mostres estan col·locades, per comoditat, dins de plaques de Petri de 9 cm. Aleshores si interessa que la càmera sigui capaç d'enregistrar tota la mostra sencera, s'ha d'adaptar l'alçada de la càmera per tal que es pugui escanejar com a mínim el diàmetre de la placa de Petri. En realitat amb l'alçada de la càmera el que es fa és decidir l'eix y de l'hipercub. El número de píxels no varia, ja que cada banda té sempre el mateix número de píxels. Per tant el que es fa és decidir on es situen els 164 píxels de cada banda. Si s'apropa excessivament la càmera la banda no cobreix tota l'alçada de la mostra i aleshores no es pot obtenir informació de tota la mostra. En canvi, si la càmera es posa excessivament elevada s'està obtenint informació de fora de la mostra, per tant, s'adquireix informació que no és útil. En quant a l'eix x, l'alçada de la càmera no afecta ja que aquest eix ve marcat pel número de bandes que es volen fer i això es configura dins del software. En quant a l'alçada del sistema d'il·luminació, aquest depèn de la posició de la càmera i s'ha d'ajustar de tal forma que il·lumini la mostra totalment. És important que la llum arribi aproximadament a tota la mostra per igual, ja que amb el software el que es mesura és reflectància vs longitud d'ona, i aquesta reflectància es veu afectada depenent de com s'il·lumina la mostra.

Un cop es col·loca l'alçada de la càmera i la font d'il·luminació, s'han de calibrar diversos paràmetres de l'equip. Per fer-ho, amb el propi equip es van facilitar uns fulls DIN A4 per calibrar l'equip. El primer full consta d'unes quantes línies negres verticals consecutives (Figura 4A). Aquest full serveix



Figura 5. Roda per enfocar la càmera.

per enfocar la lent. Es fa movent una roda fins que a la pantalla s'observen les línies de la forma més nítida possible (Figura 5). L'altre full consta d'un seguit de cercles de diferents mides (Figura 4B). Això serveix per establir la velocitat a la que la plataforma que conté la mostra s'ha de moure. Si la plataforma es mou massa lenta o massa ràpida, la imatge escanejada es veu deformada i els cercles es veuen més primos o més amples. S'ha d'adaptar la velocitat de la càmera fins que els cercles del full que s'escaneja es vegin completament circulars, sense deformitats.

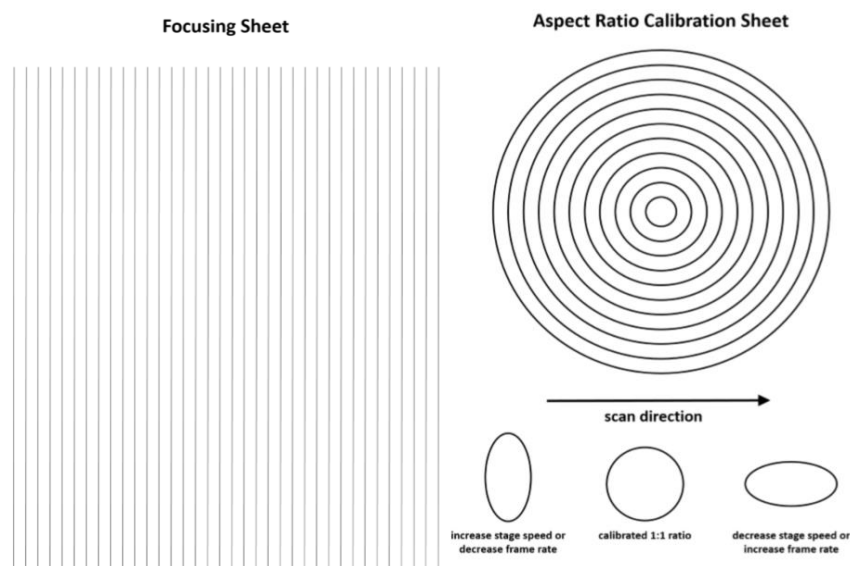


Figura 4. A. Fulla per enfocar la càmera. B. Fulla per calibrar Stage Speed i Framerate. Manual de l'equip.

Finalment queda la configuració de dos paràmetres relatius a la càmera: el *Framerate* i el *Integration Time*. Per configurar aquests paràmetres es necessita que la càmera estigui enregistrant algun full o placa que sigui del blanc més pur possible. La pròpia empresa amb l'equip també facilita una placa allargada totalment blanca que denomina com Spectralon (Figura 6). Per configurar aquests dos paràmetres esmentats de la càmera, s'ha d'enregistrar amb la càmera en viu el Spectralon i anar modificant tots dos paràmetres fins que la imatge que es veu al software sigui el més blanca possible però sense que arribi a saturar en cap punt de la imatge.

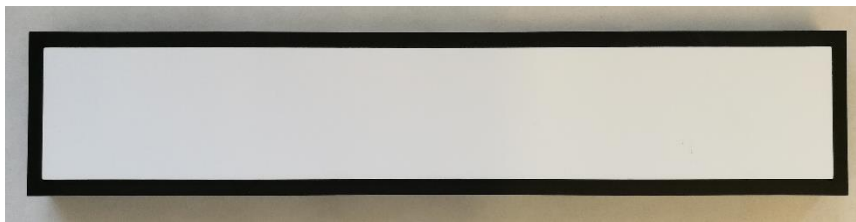


Figura 6. Spectralon

Tant per fer el calibratge de la relació d'aspecte com per ajustar els paràmetres *Framerate* i *Integration Time*, es necessita utilitzar el software. Per la relació d'aspecte es modifica la velocitat de la plataforma i això es fa dins la pestanya de "Stage" que es troba en "Tools" (Figura 7). Dins la pestanya de "Stage" per ajustar la velocitat de la plataforma es fa mitjançant el "Scanning Speed". El paràmetre "Homing Speed" fa referència a la velocitat a la que la plataforma torna a la posició inicial després d'haver fet un escaneig, paràmetre que no afecta de cap manera al resultat de l'escaneig. En quant al *Framerate* i *Integration Time*, s'ajusten dins la pestanya de "Camera" també dins de "Tools" (Figura 8). El *Integration Time* és la durada de l'adquisició d'informació per cada línia d'imatge individual. El *Framerate* és igual al número d'imatges adquirides per cada segon, i limita el màxim de *Integration Time*. Si no hi ha suficient llum s'ha de baixar el *Framerate* aleshores es pot augmentar el *Integration Time*. Mitjançant aquests dos paràmetres s'ha d'aconseguir tenir la imatge del Spectralon el més blanca possible però sense arribar a la saturació en cap píxel. Per poder observar el que està enregistrant la càmera en viu s'ha de fer clic al botó de visualització en viu (Figura 9).

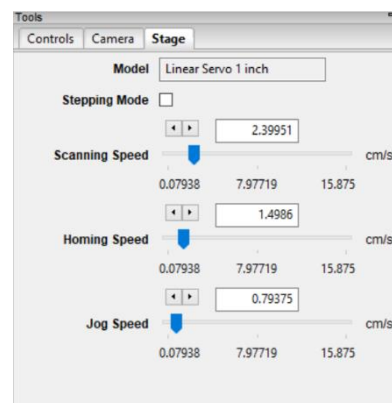


Figura 7. Pestanya de "Stage".

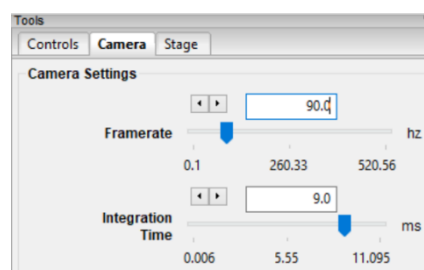


Figura 8. Pestanya de "Camera".



Figura 9. Botó de visualització en viu (F).

Només queda ja realitzar les correccions del negre i el blanc. El corrector del negre s'utilitza per eliminar el soroll fosc de la imatge. Per fer-ho, tenint tapada la lent amb el protector, es fa clic al botó de correcció del negre (Figura 10) i automàticament es corregeix. Pel que fa al blanc, es fa perquè així el programa dóna els resultats en reflectància absoluta, és una forma per estandarditzar la reflectància. Per fer-ho es col·loca el Spectralon a la plataforma i es fa clic al

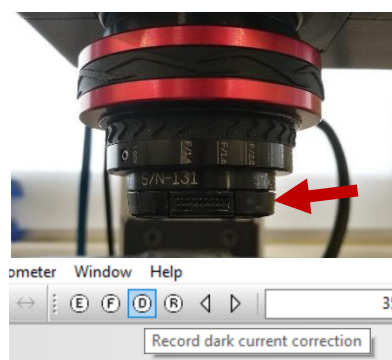


Figura 10. Correcció del negre.

botó de correcció de resposta (Figura 11). Aleshores el software té en compte el Spectralon com

a material de referència i el considera com el màxim de reflectància. Un cop fetes les correccions, les icones presenten un senyal de comprovació (*check mark* o *tick*) damunt.

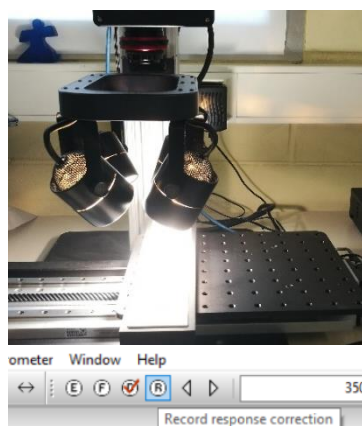


Figura 11. Correcció del blanc o resposta.

Arribats a aquest punt, l'equip ja està preparat per començar a escanejar mostres. Abans de res s'ha d'haver ajustat correctament l'alçada de la càmera ja que en cas contrari l'alçada de la mostra podria no escanejar-se sencera. La llum ha d'estar encesa i a poder ser abans de realitzar l'escaneig s'hauria d'encendre amb almenys dos minuts d'antelació. Aleshores, s'ha de col·locar la placa de petri (o qualsevol altra mostra) de forma que l'extrem esquerre de la placa coincideixi aproximadament amb la càmera, ja que per aquest extrem esquerre és per on comença a escanejar el HSI-NIR. Hi ha dues icones (Figura 12) que permeten moure la plataforma cap a la dreta o l'esquerra per marcar el punt d'inici de l'escaneig. Al costat de les icones per moure la plataforma hi ha un espai en blanc en el que es pot escriure el número de bandes que es vol escanejar (Figura 13). Això afecta a la l'eix x de l'escaneig. Finalment fent clic a la fletxa de color blau s'inicia l'escaneig de la mostra (Figura 14). Quan s'acaba l'escaneig de la mostra, la plataforma torna a la seva posició inicial automàticament. Fins que no ha tornat a la posició inicial no es pot realitzar un altre escaneig.



Figura 12. Icones per moure la plataforma esquerra o dreta.



Figura 13. Espai per escriure les bandes que es volen (per exemple 100) i la fletxa blava d'inici d'escaneig.

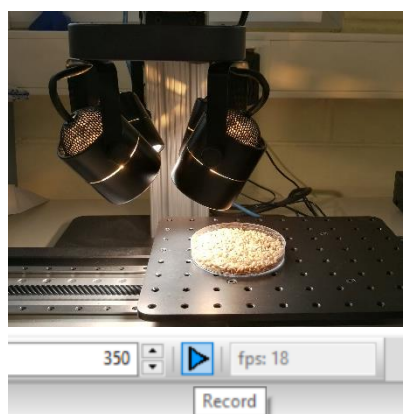


Figura 14. Escaneig d'una mostra.

Un cop s'ha escanejat una mostra, ja queda guardada en el software com a hipercub i imatge. Apareix una imatge de la mostra al centre de la pantalla amb una coloració virtual segons la interpretació de la càmera. A la part superior de la pantalla hi ha les següents eines (Figura 15):



Figura 15. Eines per treballar la imatge.

D'esquerra a dreta. La primera permet seleccionar un sol píxel i veure el seu corresponent espectre. La següent icona és per seleccionar un rectangle de píxels de dins de la mostra. La icona amb forma de llaç serveix per seleccionar una zona de píxels que nosaltres mateixos podem dibuixar. La següent icona amb forma de vareta màgica serveix per seleccionar píxels contigus al que nosaltres seleccionem i que tinguin uns espectres similars. La vareta màgica del costat també selecciona píxels amb espectres similars al que nosaltres cliquem però de tota la imatge sencera. La icona de la mà serveix per moure la imatge, les dues lopes per fer més o menys zoom. A la dreta de les lopes tenim una icona que permet adaptar la imatge a la mida de la finestra. Les dos icones següents són per rotar la imatge 90° a esquerra o dreta i les dos següents per voltejar la imatge vertical o horitzontalment.

A l'esquerra de la finestra està l'arbre de recursos (Figura 16) on estan tots els hipercubs escanejats, així com els espectres que s'han seleccionat i també les correccions (blanc i negre) fetes. Fent clic amb el botó dret damunt dels hipercubs o dels espectres, es poden guardar al disc dur. A més, també es poden exportar els espectres com arxiu de text i així es pot extreure al Excel. D'aquesta forma es poden tenir els espectres de forma numèrica que és molt útil per realitzar tractaments multivariants de totes les dades que s'obtenen.

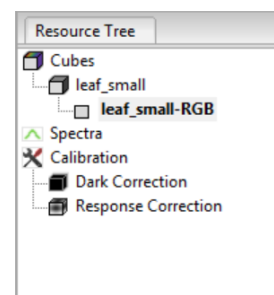


Figura 16. Arbre de recursos.

Per veure els espectres de cada píxel s'ha d'utilitzar l'eina de selecció de píxels i només fent un clic en qualsevol píxel ja sortirà l'espectre. Si es vol un espectre que representi una major part de la mostra es pot fer servir tant l'eina de selecció rectangular com la selecció amb llaç per seleccionar la zona que es vulgui. L'eina de selecció en llaç és precisa però molt lenta, en canvi amb la selecció rectangular es pot seleccionar el quadrat més gran possible dins de la mostra i així seleccionar molt més ràpid però de forma menys precisa. Aleshores fent clic amb el botó dret damunt de la selecció, es pot clicar a "Mean Spectrum" per fer un espectre mitjà de tots els píxels que inclou la selecció i inclús també fer un pretractament de dades com és fer una primera derivada mitjana clicant a "Mean First Derivative". Un cop creat l'espectre, aquest queda dibuixat en el gràfic i en la llista d'espectres de l'arbre de recursos (Figura 17).

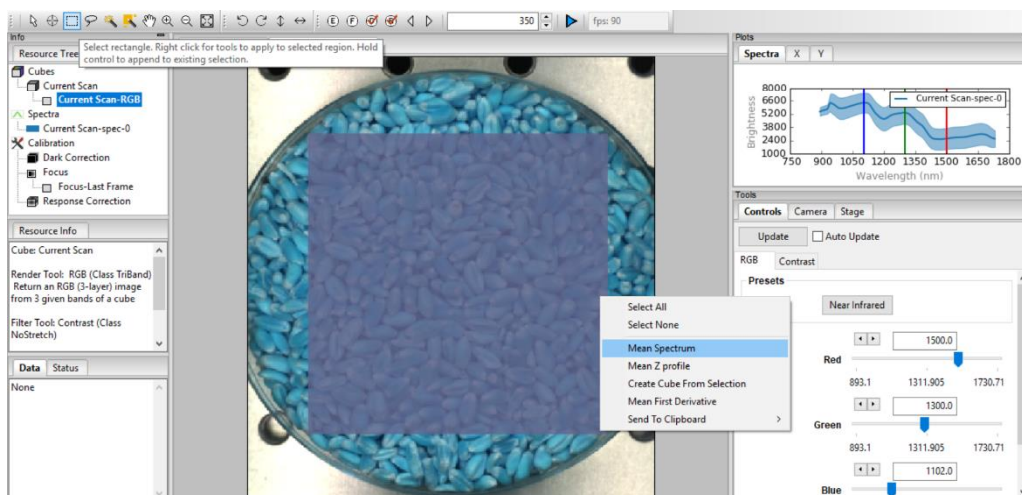


Figura 17. Selecció de l'àrea i formació de l'espectre.

A partir d'aquí, es poden fer tants escanejos de mostres diferents i espectres com es vulgui. Per poder analitzar els espectres i dades mitjançant programari multivariant, el que s'ha de fer és fer clic amb el botó dret a l'espectre que es vulgui de la llista d'espectres i elegir l'opció de "Copy Spectrum As Text". Aleshores ja està copiat l'espectre com si fossin números i només queda enganxar-los a l'Excel o qualsevol altre programa similar (Figura 18).

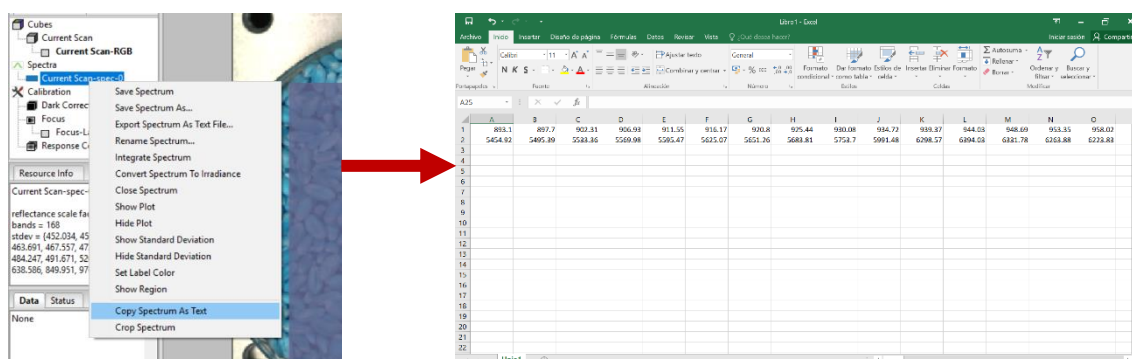


Figura 18. Extracció de l'espectre en format numèric.

Els números de la part superior de l'Excel són els "nm" de longitud d'ona i els de baix són les unitats de reflectància de l'espectre. Podem extreure a l'Excel tants espectres com es vulguin i de l'Excel passar-ho al programari multivariant per realitzar els diferents anàlisi que es vulguin.

3.3. Cerca de materials contaminats

A part de l'equip, un altre aspecte important per aquest treball són les mostres de blat amb diferents nivells de contaminació per DON. En total es van aconseguir 69 mostres (Taula 10), 14 de les quals són de blat inoculat, 21 de segó naturalment contaminat i 34 de blat també naturalment contaminat.

Taula 10. Inventari de mostres.

Blat Inoculat	Blat Naturalment Contaminat			Segó Naturalment Contaminat	
Codi	Codi			Codi	
I-1	1	15	29	S-1	S-15
I-2	2	16	30	S-2	S-16
I-3	3	17	31	S-3	S-17
I-4	4	18	32	S-4	S-18
I-5	5	19	33	S-5	S-19
I-6	6	20	34	S-6	S-20
I-7	7	21		S-7	S-21
I-8	8	22		S-8	
I-9	9	23		S-9	
I-10	10	24		S-10	
I-11	11	25		S-11	
I-12	12	26		S-12	
I-13	13	27		S-13	
I-14	14	28		S-14	

Mostres de blat inoculat

Les 14 mostres de blat inoculat es van inocular en sis condicions d'humidificació distintes: 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL, 60 mL i 70 mL. Per fer-ho vam posar 250 g de blat dins de catorze ampolles de vidre d'1 L. A cada ampolla vam posar una quantitat diferent d'aigua destil·lada: una ampolla amb 20 mL i amb 30 mL, i tres ampolles amb 40 mL, 50 mL, 60 mL i 70 mL. Després d'afegir l'aigua, es va remoure les ampolles perquè així els grans poguessin absorbir l'aigua i es van guardar a la nevera, on durant dos dies dos cops al dia es van haver de moure per aconseguir una bona absorció d'aigua. Paral·lelament es va sembrar en placa de Petri el fong que es volia per produir DON, que és *F. graminearum* (TA 3.234, Col·lecció del Departament de Tecnologia d'Aliments de la Universitat de Lleida). La sembra es va fer en dos plaques amb medi PDA baix flama per evitar contaminacions. Una de les plaques només es va sembrar en tres punts bàsicament per assegurar la puresa del cultiu i l'altra placa sí que es va distribuir el cultiu amb nansa per produir una major superfície de fong i posteriorment inocular les ampolles. Aquestes dos plaques es van incubar a 26 °C durant cinc dies. Passats els cinc dies, es va passar a inocular el fong incubat dins les ampolles amb blat que s'havia humidificat. Les plaques amb *F. graminearum* van créixer perfectament sense cap tipus de contaminació. Per inocular, es va fer una suspensió amb aigua i Tween per facilitar la dispersió de les espores. Aleshores, a cada ampolla se li va afegir 1,5mL de la suspensió feta. Un cop inoculat el fong, es van posar les ampolles a l'estufa d'incubació a 26 °C. Aproximadament cada dos o tres dies s'havien d'anar remonent les ampolles per trencar els micelis que s'anaven formant i així evitar un creixement

excessiu, ja que el que es volia és que el blat estigués contaminat però amb el mínim canvi exterior, és a dir, que semblés el més natural possible. Les ampolles van estar incubant durant 28 dies. Al final de la incubació, l'últim pas que es va haver de fer va ser assecar les mostres. Es van posar els grans de cada ampolla en diferents recipients i es van introduir al forn durant 24 h a uns 55 °C. L'objectiu era que tots els grans tinguessin aproximadament la mateixa humitat ja que sinó en fer els escanejos les diferències observables podrien ser degudes a la humitat i això no interessava. Passades les 24 h, una part dels grans es van col·locar en plaques de Petri per fer els escanejos, una altra per determinar la concentració de DON i humitat, i la part restant al congelador per evitar qualsevol possible proliferació, per possibles usos posteriors.

Mostres de segó naturalment contaminat

Degut a que encara volíem tenir més mostres contaminades amb DON, vam decidir comprar segó de blat perquè érem coneixedors de que el segó acostuma a tenir una elevada concentració de DON ja que és una part que en moldre el gra acumula fàcilment DON. En canvi altres parts com la farina, en moldre acaba reduint la seva concentració en micotoxina (Vidal et al., 2016).

En total es van aconseguir vint-i-una mostres de segó: S1-S21. Es van comprar en varies botigues de dietètica repartides per la ciutat de Lleida i també en supermercats com Carrefour i Mercadona. De les vint-i-una mostres es va determinar la concentració de DON que hi havia i es va preparar una placa de Petri per cada mostra destinada a l'escaneig per HSI-NIR.

Mostres de blat naturalment contaminat

Ja que l'objectiu principal del projecte era treballar amb gra de blat contaminat naturalment, també es va mirar d'aconseguir mostres de blat que estigués contaminat per DON de forma natural en el camp. El blat es va poder aconseguir gràcies a una fàbrica de pinsos, que periòdicament ens anava subministrant mostres de lots que ingressaven a la seva fàbrica i que ells havien anat agafant per mesurar diversos paràmetres a l'entrada de blat a la fàbrica.

Gràcies a aquesta fàbrica finalment vam aconseguir trenta-quatre mostres de blat contaminat de forma natural. De cada mostra, vam determinar la concentració i vam preparar les mostres dins de plaques de Petri per escanejar. A més, també ens van facilitar alguns paràmetres que ells mateixos mesuren: proteïna bruta, humitat, greix i cendres.

Mètodes d'anàlisi

De totes les mostres que es van aconseguir, es va determinar la concentració de DON. I de les que vam inocular també la humitat. Per determinar el contingut d'humitat, el que es va fer va

ser posar unes càpsules al forn a 100 °C i en treure-les posar-les a refredar dins d'un dessecador de vidre amb gel de sílice per evitar l'absorció d'humitat. Després, es van pesar les càpsules i es van posar grans fins cobrir tota la superfície (10 g) i es van pesar les càpsules amb els grans dins. Finalment les vam deixar al forn durant 24 h a 100 °C. Passades les 24 h, es van haver de treure les càpsules del forn i introduir-les a refredar en el dessecador durant més de 30 min. Finalment només es va haver de tornar a pesar les càpsules amb els grans i veure la diferència de pes, que és deguda a la pèrdua d'aigua exclusivament durant les 24 h al forn, ja que la matèria seca roman intacta. La humitat doncs es calcula dividint la diferència de pes entre el pes de la mostra del dia anterior i multiplicant per 100.

En quant a la determinació de la concentració de DON en les mostres, el mètode que es va fer servir va ser un ELISA. Exactament es va fer amb el kit RIDASCREEN® DON de Biopharm. Es tracta d'un immunoassaig enzimàtic competitiu. Primer de tot es va haver de fer l'extracció de DON de les mostres. Això es va fer triturant les mostres de blat fins formar un pols. El segon no va fer falta triturar-lo perquè ja tenia granulometria fina. Aleshores es van agafar només 5 g i es van posar en matrassos ambre de 100 mL per evitar el contacte amb la llum. Aquests 5 g de blat es van mesclar amb 25 mL d'aigua destil·lada per extreure el DON.

Es va afegir un imant al matràs per agitar la mescla en un agitador magnètic durant 3 minuts. Després d'agitar la mescla es va filtrar una petita quantitat de l'extracte que anava destinada a la quantificació per ELISA. Després, es van fer dilucions en els extractes que fessin falta, ja que sinó podrien no entrar dins la corba de calibrat per determinar la concentració. Un cop fetes les dilucions, es van agafar només 50 µL de cada extracte per afegir-los a cada pouet del kit, que té enganxat al fons anticossos dirigits a la captura d'anticossos anti-DON. A més també es posen a 10 pouets les solucions patró, necessàries per poder realitzar la corba de calibrat, per duplicat. Després de posar les mostres a cada pouet, es posen 50 µL d'enzim conjugat i seguidament 50 µL d'anticòs anti-DON a cada pouet. Es mou lleugerament i es deixa incubant a temperatura ambient durant 30 min protegits de la llum. Passats els 30 min es realitza el rentat dels pouets amb tampó de neteja 3 o 4 cops seguits per assegurar que al pouet només queda el que s'ha lligat als anticossos del pouet. Un cop rentat s'afegeixen 100 µL de substrat (o cromogen) i es deixen incubant 15 min a temperatura ambient protegits de la llum. Finalment, passats els 15 min, s'afegeixen 100 µL de solució d'aturada a cada pouet, es mou lleugerament i es posa al espectròmetre per mesurar l'absorbància a 450nm. Es prepara la lectura configurant tot el software del PC i finalment s'obtenen els resultats tant en paper com al software del PC.

3.4. Variables que poden afectar a les lectures de reflectància

Alçada i paràmetres de la càmera

A l'hora d'escanejar hi ha diversos paràmetres i factors que poden influir, fent que l'escaneig sigui millor, pitjor o també amb una millor o pitjor repetibilitat. Un dels primers paràmetres a tenir en compte és l'alçada de la càmera. Aquesta ha de ser lo suficientment alta com per permetre l'escaneig de la mostra sencera però també lo suficientment baixa com perquè el nombre de píxels

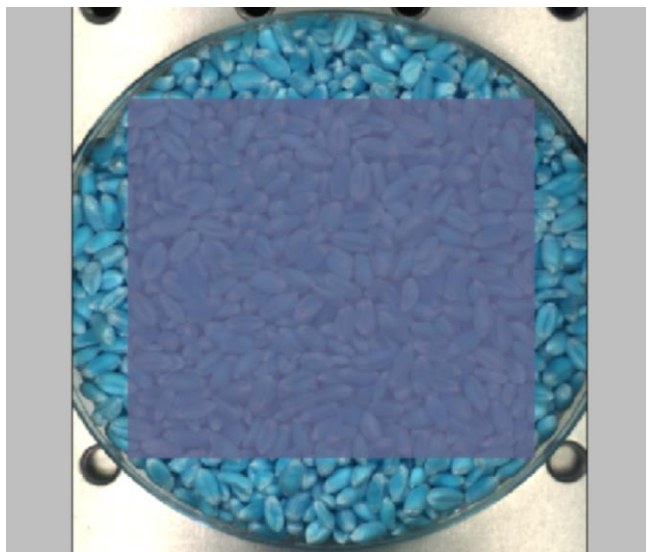


Figura 19. Imatge escanejada d'una mostra.

que hi hagi dins de la mostra sigui el major possible. En el nostre cas l'alçada utilitzada ha estat d'uns 22,5 cm aproximadament. Les imatges que obtenim de les mostres (Figura 19) no acaben de mostrar la placa de Petri sencera però prioritzem tenir una major concentració de píxels en la mostra. El fet de que no es mostri la placa de Petri sencera no ens afecta ja que la zona que nosaltres utilitzem per obtenir l'espectre queda igualment dins de la imatge. El número de bandes utilitzat és de 350. No necessitem més ja que aquest número ens permet escanejar la x de la mostra sencera tot i que si volguéssim escanejar més o menys bandes no afectaria al nostre resultat sempre i quant la zona que utilitzem per obtenir l'espectre quedi completament dins la imatge. Pel que fa al *Framerate* utilitzem 90 fps (hz) amb un *Integration Time* de 10.1 ms. Agafem els 90 fps perquè és el màxim que ens permet utilitzar la càmera tenint en compte l'alçada i aconseguint el màxim d'il·luminació en la mostra sense arribar a saturar en cap punt. La *Scanning Speed* és de 2,39951 cm/s, que és la velocitat de plataforma que necessitem perquè els escanejos surtin amb un aspecte real, sense tenir cap tipus de deformitat.

Il·luminació

En quant a factors externs que poden afectar l'escaneig, hi ha diversos. Un d'ells és la il·luminació tant l'ambiental com la del propi HSI-NIR. Per veure la influència de la llum en l'escaneig, es van plantejar dos experiments diferents. Per la llum ambiental es van realitzar tres escanejos d'una mateixa mostra il·luminada amb el sistema de l'equip i també exposada a diferents intensitats de llum ambiental: sense llum, poca llum o molta llum. Aquests escanejos es van tornar a repetir dos dies diferents més i amb altres mostres per veure si els resultats eren fruit de la casualitat o

no. Les diferències observables en els espectres serien degudes a aquest factor. En quant a la il·luminació de l'equip, es van plantejar tres proves en dies separats de deu escanejos d'una mateixa mostra exposada a la il·luminació de l'equip i amb un interval entre escaneig d'un minut. Qualsevol variació en els espectres dels escanejos només podria ser causada per variacions en la il·luminació del HSI-NIR.

Humitat

La humitat del gra també pot ser un gran factor diferenciador. De fet, el NIR s'acostuma a utilitzar en la indústria per determinar continguts d'humitats en cereals i altres aliments. Tot i així es va plantejar una prova per triplicat per veure com afecta aquesta humitat en els escanejos. Es va agafar i omplir amb 35 g de blat tres plaques de Petri sense afegir res d'aigua. El blat en qüestió inicialment tenia una humitat del 10%. Aleshores es va anar afegint aigua destil·lada d'1 mL en 1 mL fins arribar a 5 mL. Cada cop que afegíem el mL d'aigua, deixàvem les mostres a la nevera durant 24 h perquè així els grans absorben l'aigua. D'aquesta manera es pot comparar els espectres d'una mateixa mostra de blat però amb diferents continguts d'aigua, les diferències del qual són exclusivament degudes a la variació en la humitat.

Temperatura

La temperatura de les mostres pot ser un factor diferenciador també. Per determinar-ho, l'experiment plantejat va ser escanejar tres cops dos mostres diferents de blat però que havien estat exposades 24 h a diferents temperatures: 5 °C, 26 °C i 50 °C. La selecció d'aquestes temperatures és deguda a que són temperatures a les que es poden trobar exposades les mostres abans de l'escaneig. Els 5 °C corresponen a la temperatura de la nevera que és on guarden les mostres quan no s'han d'utilitzar. Els 26 °C és la temperatura de la sala d'incubació on es deixaven incubant les mostres de blat inoculat i també una temperatura propera a la del laboratori. En quant als 50 °C, simplement es va elegir per veure si una temperatura més elevada podria afectar a les lectures. Determinar la variabilitat o no deguda a la temperatura ens permet decidir si és necessari que les mostres tinguin una temperatura similar abans de l'escaneig o si és indiferent.

Orientació dels grans

Un altre factor a tenir en compte és l'orientació dels grans. Segons la posició del gra que escanegem els resultats poden ser distints. Per això es van plantejar dos proves amb l'objectiu de determinar la influència o no de l'orientació dels grans tant a nivell individual com a nivell de placa. A nivell de gra individual es va preparar una placa de Petri amb una cartolina negra mat

al fons per evitar qualsevol tipus de reflex i es van col·locar quatre grans amb una orientació comú (costat còncav o convex). Aleshores, es van escanejar i seguidament es van tornar a orientar els grans però amb el costat invers i es van tornar a escanejar. En aquest cas per extreure els espectres la selecció dels grans es va fer amb l'eina de selecció amb llaç, ja que ens permetia fer seleccions amb la forma del gra. Aquesta prova es va repetir dos cops més en dies separats i utilitzant grans diferents per veure si les conclusions extretes dels resultats coincidien entre elles.

En quant a la influència de l'orientació dels grans a nivell de placa, la prova consistia en omplir dos plaques de Petri i escanejar aquestes mateixes plaques quatre cops seguits però remonent els grans entre cada escaneig per variar l'orientació dels grans dins les plaques. En aquest cas l'extracció dels espectres si es realitzava amb l'eina de selecció rectangular utilitzada normalment.

Àrea de selecció

L'àrea de selecció també és important. Per obtenir un espectre el més representatiu possible de tot el blat de la placa de Petri, s'hauria de seleccionar tot el cercle que forma la placa de petri i així obtenir l'espectre mitjà de tota la mostra. Tot i així, per estalviar temps, s'utilitza l'eina de selecció rectangular i es forma un quadrat el més gran possible tocant amb els quatre costats de la placa (Figura 20). No s'aconsegueix englobar tota la mostra però sí una

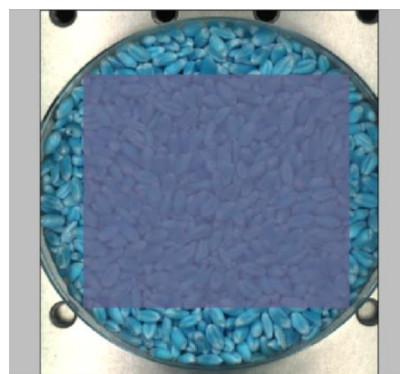


Figura 20. Àrea de selecció d'una

bona part. Al tractar-se de mostres molt heterogènies, es volia saber si depenent de quina zona es seleccionés, el resultat variaria molt o no. Per descobrir-ho es va dissenyar una prova, la qual consistia en dividir una placa en vint-i-un quadrants de diferents mides per tal de determinar la variació d'espectres dins d'una mateixa placa i a partir de quina mida de selecció la variació era menor. Un quadrant ocupava la gran part de la placa (selecció que utilitzem normalment), quatre quadrants un per cada quart de placa (1/4 del quadrant gran), i per cada un d'aquests quadrants mitjans s'han agafat quatre quadrants més (1/16 del quadrant gran) (Figura 21). Simplement es van escanejar tres mostres i utilitzant l'eina de selecció rectangular es van anar fent espectres dels diferents quadrats plantejats. A més

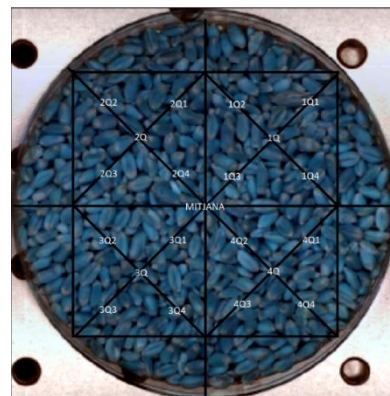


Figura 21. Quadrants de selecció per fer la prova.

també el que es volia veure és si alguns espectres de quadrants més petits es podien solapar amb espectres d'altres plaques que tenien espectres mitjans de les àrees de selecció grans molt diferents.

Repetibilitat

Finalment queda la repetibilitat del HSI-NIR. És molt important que si tots els paràmetres i el calibratge de l'equip són els mateixos, els resultats siguin sempre els mateixos o similars, independentment del dia o moment del dia que es faci la lectura. És per això que es van plantejar unes proves per determinar fins quin punt l'equip demostra una bona repetibilitat o no. Una prova consistia en repetir l'escaneig d'una mateixa mostra en diferents dies i l'altra en escanejar la mateixa mostra diversos cops en un mateix dia. Per provar la repetibilitat de l'equip entre diferents dies, es va escanejar durant 7 dies seguits la mateixa mostra i sota les mateixes condicions. La lectura es feia a primera hora del matí i era sempre el primer escaneig del dia. A més, es deixava 3 minuts la llum de l'equip encesa per evitar variacions degudes a la il·luminació. En quant a la repetibilitat de l'equip en escanejos d'un mateix dia, vam escanejar la mateixa mostra 5 cops un mateix dia, amb una hora d'interval entre cada escaneig en les mateixes condicions també.

3.5. Tractament estadístic de les dades i avaluació de la possibilitat de discriminació

Dels escanejos de les mostres, podem obtenir els espectres mitjans de cada mostra i de cada espectre el seu valor numèric. Pretendre extreure conclusions en quant a la possibilitat de discriminar entre mostres contaminades i sanes simplement mitjançant la comparació entre espectres és una tasca molt complicada. És per això que es necessita realitzar un tractament de les dades numèriques extretes dels espectres mitjançant una anàlisi multivariant. Mitjançant aquesta eina es pot aconseguir molta més informació i d'aquesta forma treure conclusions d'allà on mitjançant l'observació d'espectres hauria estat pràcticament impossible.

L'anàlisi multivariant l'hem realitzat mitjançant dos programaris dedicats a aquest anàlisi estadístic de dades, el JMP Pro v13 de SAS (Cary, NC, USA) i el The Unscrambler v9.7 de CAMO (Oslo, Noruega). Tots dos programes ens permetien fer aproximadament el mateix, però en algunes eines ens era més còmode l'un o l'altre. Bàsicament les eines utilitzades són tres: Anàlisi de Components Principals (PCA, *Principal Component Analysis*), Mínims Quadrats Parcial (PLS, *Partial Least Squares*) i Anàlisi Discriminant.

El PCA és una tècnica d'anàlisi multivariant basada en la projecció de les dades sobre els eixos que defineixen les direccions de màxima informació de les mateixes. Això ens permet descriure les dades obtenint la informació més rellevant de les mateixes. El que es fa amb una PCA és un canvi de base (eixos) definint un nou sistema de coordenades pel conjunt original de dades. Considerant el pla que defineix la màxima informació de les dades, el primer d'aquests eixos està definit en la direcció de màxima variància (informació), que correspon a la mínima suma dels residuals al quadrat i el segon eix és ortogonal al primer eix (per evitar la repetició d'informació i garantir la independència respecte a la variable que defineix aquest) en la direcció de màxima variància, és a dir, la mínima suma dels residuals al quadrat. Aquests eixos es coneixen com Components Principals (PC), essent el primer eix el PC1 i el segon el PC2. D'aquesta manera es separa i analitza la informació més important i es destria aquella que no ens és útil i només aporta soroll.

El PLS es tracta d'una tècnica d'anàlisi multivariant que ens permet relacionar les variables de les nostres dades mitjançant regressions, per poder obtenir les posteriors prediccions. Crea models lineals basats també en projectar les nostres dades sobre unes noves variables, calculades ara a partir de combinacions de les variables (X) que maximitzen la covariància entre aquestes X i les respostes (Y). Un cop realitzada aquesta projecció, la regressió posterior entre les esmentades variables condueix a les millors prediccions possibles de la Y sobre les X esmentades.

L'Anàlisi Discriminant és una altra tècnica estadística multivariant que té com a finalitat descriure les diferències significatives entre més d'un grup d'objectes sobre el qual s'observen unes variables discriminants, és a dir, separar les mostres en funció de les seves diferències (agrupar-les per les seves similituds) basades en unes distàncies calculades segons la informació que contenen. Per tant, és un model de predicció d'una variable a partir de variables classificatòries. D'aquesta forma podem crear agrupacions per diferents nivells de contaminació i aleshores predir a quin grup pertany una mostra de blat escanejada amb l'equip.

4. Resultats i discussió

4.1. Contaminació per DON en les mostres analitzades

Les anàlisis de les mostres dona un interval ampli de concentracions (Taula 11).

Taula 11. Contaminació de DON en les mostres.

Segó Naturalment Contaminat		Blat Naturalment Contaminat				Blat Inoculat	
Codi	DON (ppb)	Codi	DON (ppb)	Codi	DON (ppb)	Codi	DON (ppb)
S-1	198.99	1	25.34	22	72.22	I-1	18.52
S-2	168.28	2	<18.50	23	94.97	I-2	69.1
S-3	178.96	3	20.13	24	49.17	I-3	1345.34
S-4	47.43	4	334.26	25	2833.96	I-4	336.36
S-5	51.27	5	<18.50	26	5372.06	I-5	759.46
S-6	117.39	6	<18.50	27	1276.45	I-6	125.85
S-7	218.16	7	52.91	28	2476.47	I-7	<92.50
S-8	274.2	8	20.94	29	1184	I-8	111.04
S-9	222.41	9	33.79	30	218.91	I-9	378.93
S-10	194.41	10	200.98	31	2243.7	I-10	323.05
S-11	1586.12	11	<18.50	32	3188.58	I-11	107.77
S-12	50.7	12	23.47	33	1937.56	I-12	203.25
S-13	45.04	13	20.36	34	818.52	I-13	191.84
S-14	52.51	14	<37			I-14	415.02
S-15	43.98	15	56.92				
S-16	69.65	16	411.69				
S-17	44.35	17	50.14				
S-18	355.36	18	<37				
S-19	294.21	19	40.59				
S-20	85.25	20	<37				
S-21	93.32	21	78.99				

A l'hora de crear el model, lo ideal seria que les mostres estiguessin el millor repartides en quant a concentració. De les mostres de segó només 1 (5%) (Figura 22) supera el límit màxim legal de 750 µg/kg. De les 20 mostres restants que es troben davall del límit la majoria es troben en concentracions baixes. De fet, 10 de les mostres, que és gairebé la meitat del total de les mostres (47%) es troben per sota dels 100 ppb, mentre que de 100 a 200 ppb i de 200 a 300 ppb n'hi han 5 (24%) i 4 (19%) mostres, respectivament. En canvi, a partir de 300 ppb fins el límit màxim només tenim 1 (5%) i només 1 (5%) que superi el límit màxim. Aquesta distribució no seria la ideal ja que hi ha una elevada quantitat de mostres amb poca contaminació en canvi molt poques amb concentració elevada.

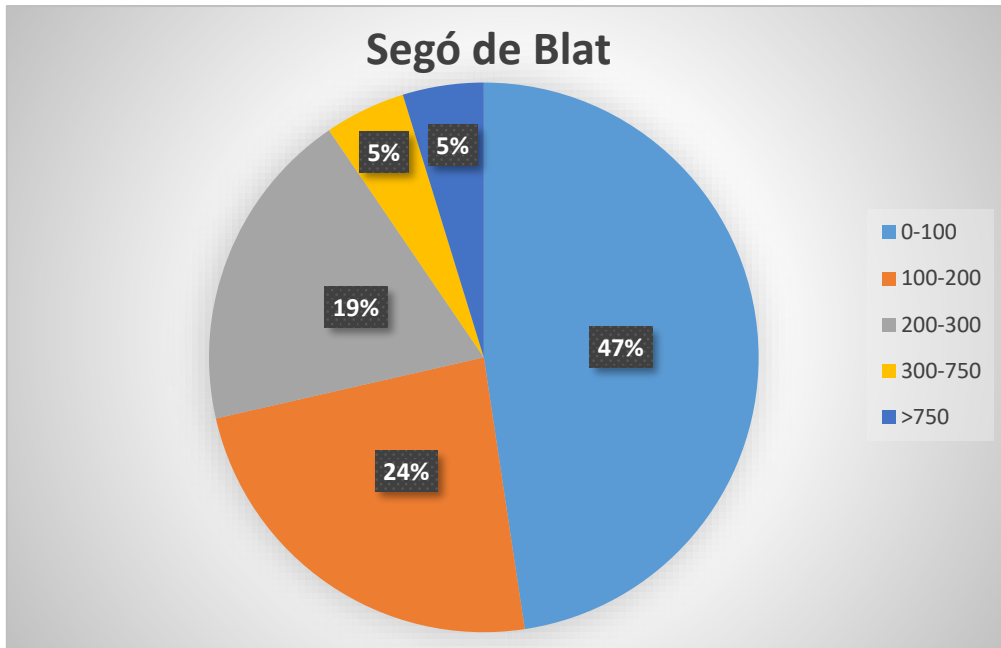


Figura 22. Distribució de les mostres de segó de blat en relació al DON.

En quant al blat naturalment contaminat, la distribució de les 34 mostres és encara més irregular (Figura 23). De totes les mostres, 21 (62%) es troben per davall dels 100 ppb. Dels 100 ppb fins el límit màxim només 6 (18%) i 7 superen el límit (20%).

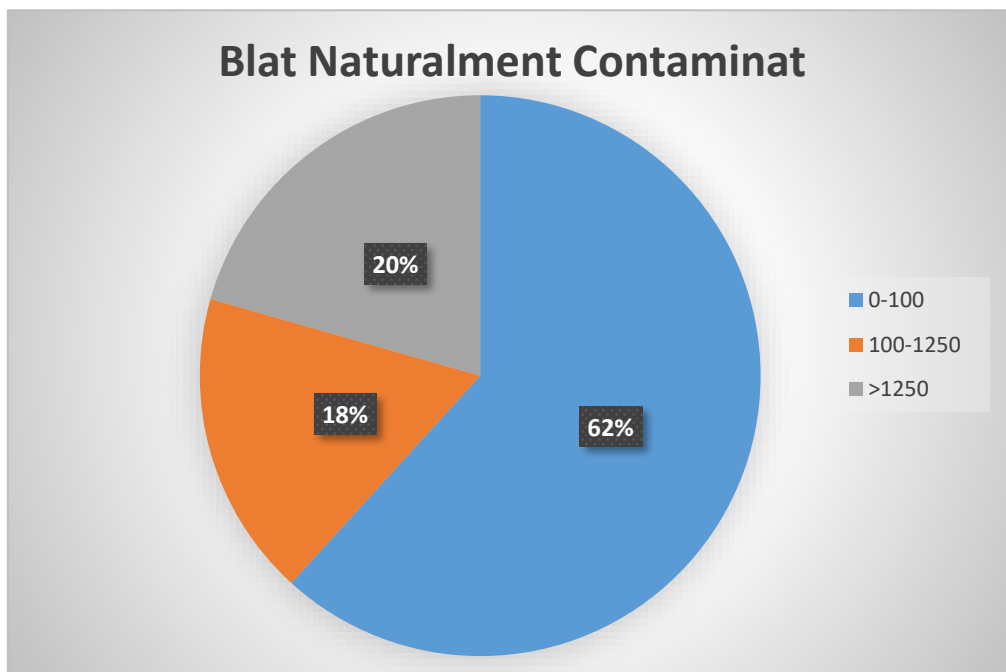


Figura 23. Distribució de les mostres de blat naturalment contaminat en relació al DON.

Pel que fa al blat inoculat (Figura 24), de 14 mostres, 3 (21%) es troben per davall dels 100 ppb, 4 (29%) entre els 100 i 200 i també entre els 200 i 400. A partir dels 400 fins 1250 ppb hi ha 2 (14%) mostres i només 1 (7%) superant 1250 ppb. De totes formes, tot i que la distribució de les mostres poc contaminades és bona, hi ha poques que tinguin una elevada contaminació. Per tant, la distribució tampoc és massa bona.

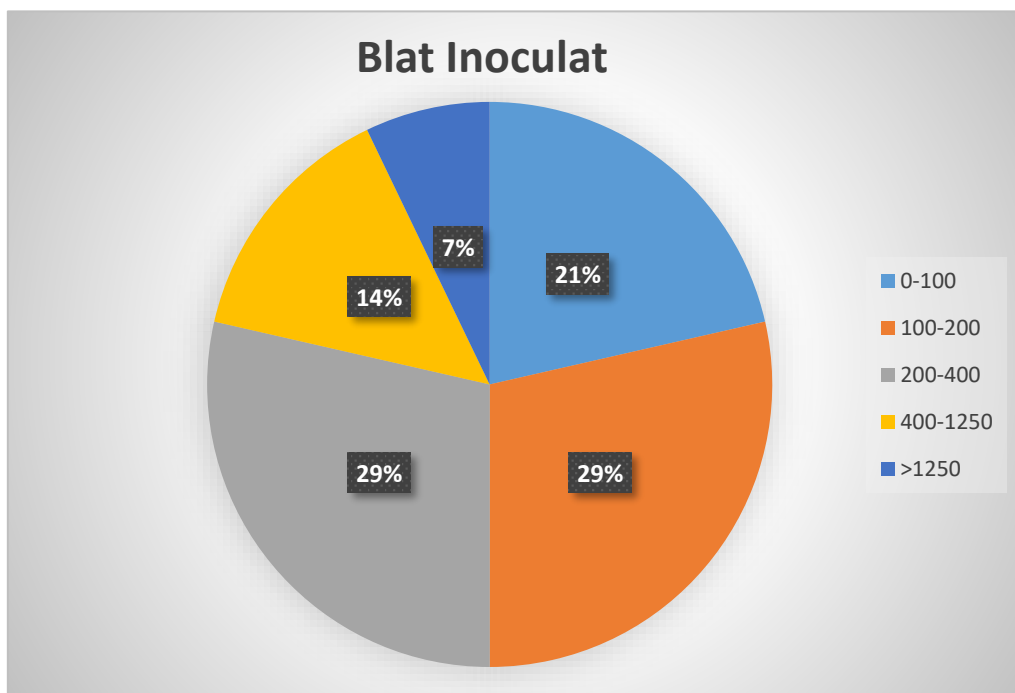


Figura 24. Distribució de les mostres de blat inoculat en relació al DON.

Cal destacar que la tècnica ELISA a l'hora de determinar la concentració de DON per aquest experiment no és la millor. Quan les mostres a determinar sabem que tenen concentracions elevades, l'extracte de la mostra s'ha de diluir perquè pugui entrar dins de l'interval de quantificació del kit. Algunes dilucions han de ser molt elevades i aleshores una mínima diferència entre les dilucions d'un mateix extracte fa variar considerablement el resultat final. No obstant, per les mostres amb una concentració més baixa no fa falta diluir o només diluir poc, per tant, en aquestes la fiabilitat i repetibilitat és molt millor.

4.2. Variables que poden afectar a les lectures de reflectància

Il·luminació

Un dels factors que vam valorar com a possible alterant de les lectures és la il·luminació. Vam diferenciar entre dos il·luminacions: la ambiental de la sala i la del propi HSI-NIR. Després de realitzar les proves, els resultats van confirmar que la llum és capaç de ser una font de variabilitat en els resultats dels escanejos, però no la llum ambiental sinó que solament la llum de l'equip. Tal i com es pot demostrar en la Figura 25, la llum de la sala no afecta a l'escaneig. Es van fer

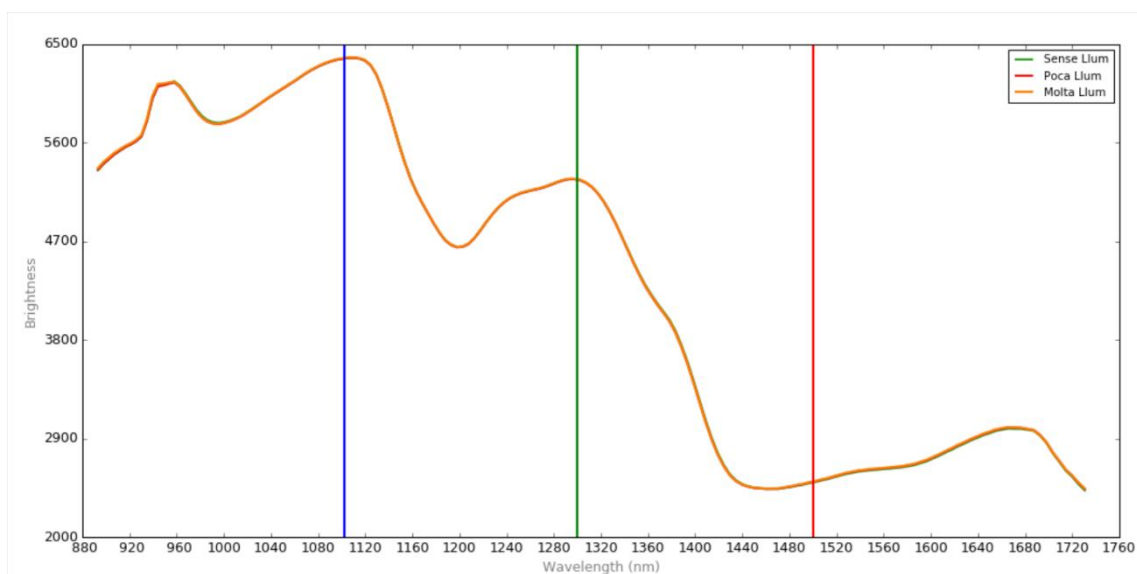


Figura 25. Espectres a diferent il·luminació de la sala.

tres escanejos a diferent intensitat de llum dins del laboratori (sense, poca i molta llum) i tots tres donen exactament els mateixos espectres. Per tant, l'efecte de la il·luminació ambiental en els escanejos és nul ja que la llum que li arriba és mínima en comparació a la que li arriba des del sistema d'il·luminació del propi HSI-NIR. En canvi, aquest últim sí que té un gran efecte en els escanejos. L'equip no ens permet regular la intensitat de llum com a tal que volem dirigir a la mostra. Però el temps que porta encès el sistema d'il·luminació de l'equip afecta molt a l'escaneig ja que la intensitat lluminosa sembla no ser la mateixa en tot moment. Els escanejos d'una mateixa mostra a diferents temps de funcionament (de 0 a 10 minuts), tal i com es pot observar en la Figura 26, demostren que tenen un efecte important en els espectres. Queda clar que la diferència entre el minut 0 (escanejar només encendre la llum) i el minut 1 (un minut després d'encendre la llum) és molt gran. Per tant s'ha de vigilar a l'hora de fer els diferents escanejos i no realitzar-los entre el minut 0 i 1 ja que les diferències visibles podrien no ser degudes al que es vol trobar sinó a la llum. A partir del minut 1 es veu que a mesura que passen els minuts també van havent variacions, però aquestes són molt menors en comparació al primer minut. Entre el minut 1 i el 2 també s'observa una variació més o menys gran tot i que

molt més petita que la observable entre el minut 0 i 1. A partir del minut 2, les variacions són més petites tot i que existents. Per tant, com a conclusió d'aquesta prova queda clar que no

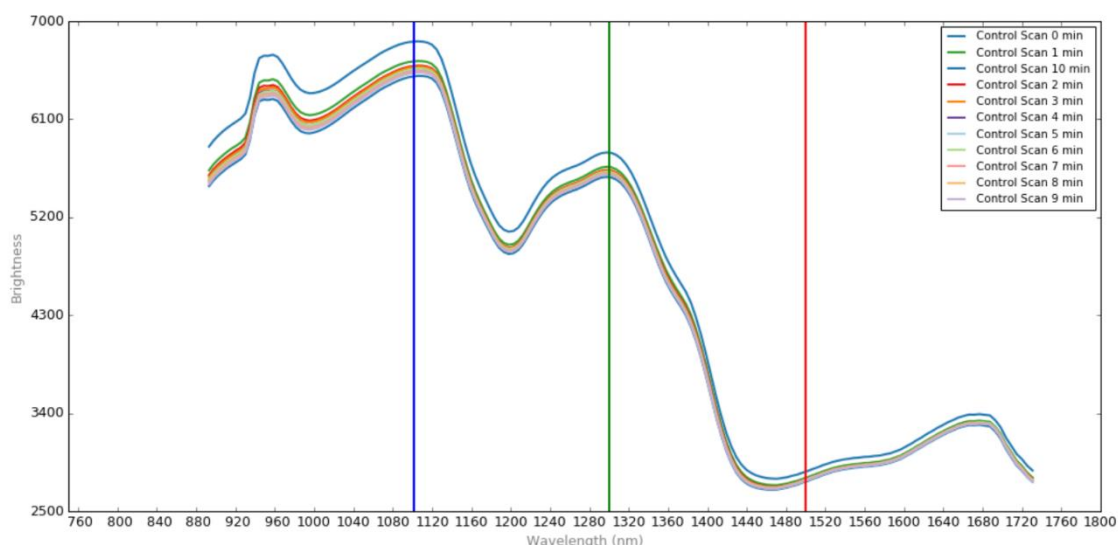


Figura 26. Espectres a diferents temps de funcionament del sistema d'il·luminació.

s'han de realitzar escanejos entre el minut 0 i 1 en cap dels casos. Es tal la diferència entre els espectres, que es veu una major diferència entre el minut 0 i 1 que entre el 1 i el 10. Així que es recomana realitzar els escanejos a partir del minut 1 i a poder ser millor si és a partir del minut 2, ja que encara s'observen menys diferències al pas dels minuts. Per aquesta raó els escanejos els realitzem quan han passat com a mínim 2 minuts. A més també seria precís realitzar els escanejos amb la menor separació de temps possible per evitar que passi gaire temps entre el primer i últim escaneig.

Humitat

Un altre factor és la humitat de les mostres. Les proves que es van plantejar ens permeten saber fins quin punt pot afectar a les nostres lectures els diferents continguts d'aigua que puguin tenir les mostres. És sabut que una de les principals aplicacions del NIR en la indústria és per determinar la humitat relativa o contingut d'humitat de cereals o altres aliments (Peiris et al., 2013), per tant era d'esperar que el fet d'humidificar les mostres fos una font de variabilitat. I en efecte, tal i com demostra la Figura 27, el contingut d'humitat de les mostres es tracta d'una gran font de variabilitat. En la prova de la Figura 27, la mostra utilitzada era exactament la mateixa, l'únic que variava era la quantitat d'aigua afegida. Per tant, tota aquesta variació mostrada és deguda únicament a la diferència d'humitat de la mostra. L'espectre de la mostra sense aigua afegida és el que té valors de reflectància majors. En canvi la mostra amb major quantitat d'aigua afegida (5 ml) és la que presenta l'espectre més baix de tots. L'increment en la quantitat d'aigua afegida fa que cada cop els espectres siguin més baixos. Per tant es demostra

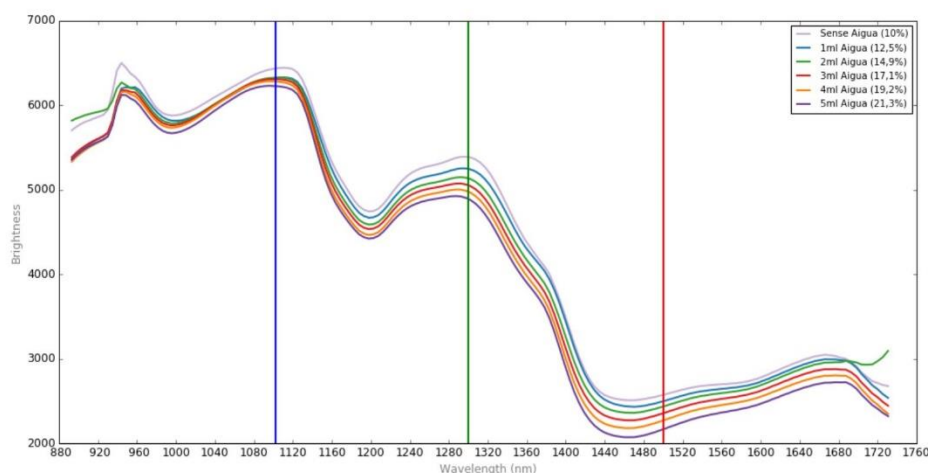


Figura 27. Espectres d'una mateixa mostra amb diferent contingut d'aigua.

una bona correlació entre els espectres i el contingut d'aigua afegit. En la mostra que no s'ha afegit aigua la humitat és del 10%. Per cada mL d'aigua que s'afegeix la humitat va augmentant. La mostra amb 1 mL d'aigua afegit té una humitat de 12,5%, la de 2 mL té un 14,9%, la de 3 mL té 17,1%, la de 4 mL té 19,2% i per últim la de 5 mL arriba fins el 21,3%. La forma dels espectres és la mateixa però es veuen desplaçats cap a baix entre més humitat hi hagi en la mostra. Amb aquestes proves es demostra doncs que és important que les mostres continguin una humitat similar ja que és una gran font de variabilitat. En cas que el contingut d'humitat fos diferent, s'hauria d'articular algun tipus de correcció abans de plantejar la discriminació segons la presència de DON. Afortunadament, les mostres utilitzades en el treball tenen una humitat molt similar, per tant, aquesta no té una influència significativa en les diferències entre els espectres.

Temperatura

Pel que fa a la temperatura, tal i com es pot veure a la Figura 28, sembla que no té una gran influència en els espectres. Cal remarcar que és la temperatura a la que ha estat exposada la placa de Petri que conté el blat, no la temperatura a la que es troba exactament el blat. Per tant,

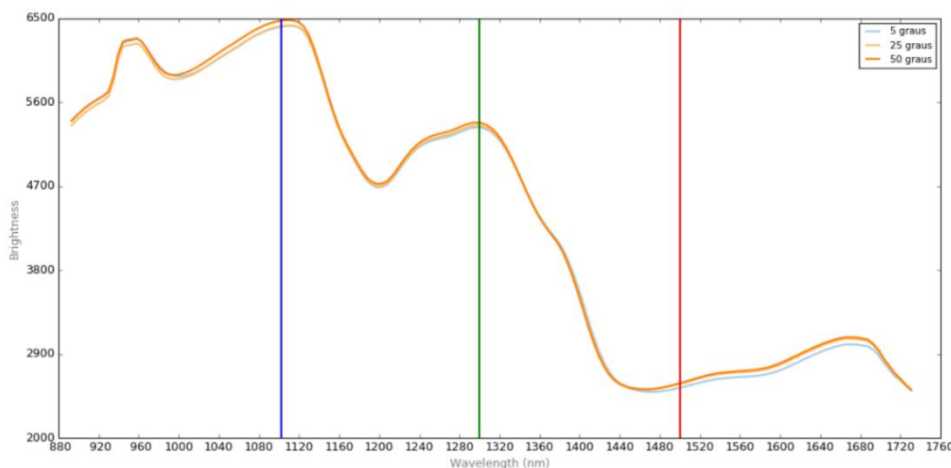


Figura 28. Espectres de mostra exposada a diferents temperatures.

tot i que la temperatura d'exposició sigui suficientment diferent, pot ser que en realitat la temperatura del blat no sigui gaire diferent. De totes formes el que ens interessa en realitat és la temperatura a la que ha estat la mostra durant l'emmagatzematge, al laboratori o incubació, per tant amb la temperatura d'exposició ja tenim el necessari. En quant als resultats, els espectres a totes tres temperatures és bastant similar tot i que hi ha certs punts on es mostra una mínima diferència. D'aquesta manera, no podem descartar que la temperatura pugui tenir alguna influència en els resultats, però a la temperatura a la que nosaltres treballem l'efecte no és gairebé apreciable.

Orientació dels grans

En quant a l'orientació dels grans, aquesta té també un gran efecte en els espectres dels grans. Un mateix gra però orientat de diferent forma dóna un espectre diferent. La Figura 29 correspon al resultat d'una de les proves on es demostra que l'orientació dels grans fa variar l'espectre obtingut. Es pot observar en els espectres clarament que els quatre grans tenen diferent espectre depenent de l'orientació que tenen. A més, aquest efecte de l'orientació no té un comportament que es pugui predir ja que no té una tendència comú en els quatre grans. Aquest

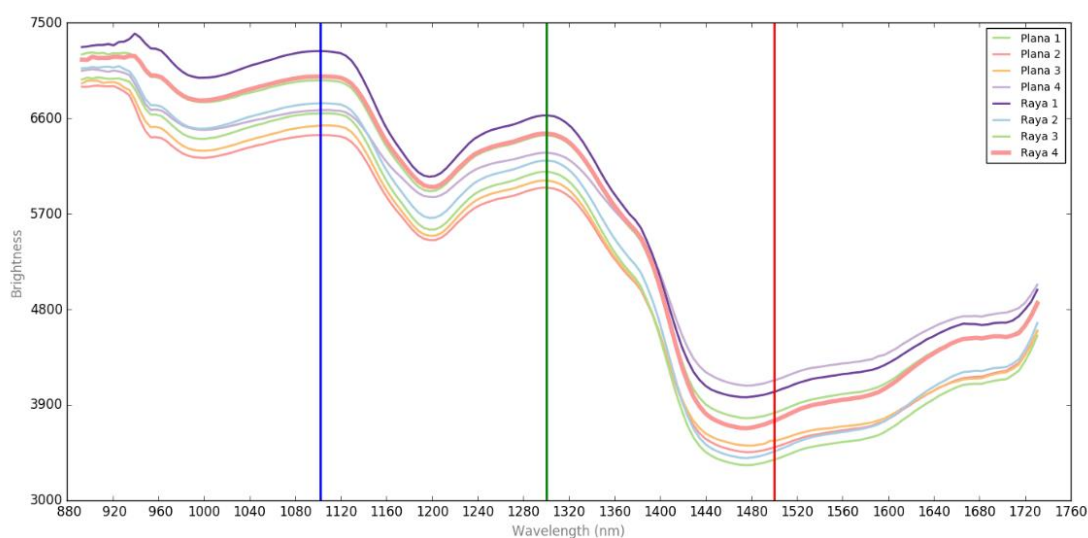


Figura 29. Espectres segons orientació dels grans.

és un factor que pot ser preocupant ja que si l'efecte orientació influeix tant en el resultat final, pot ser força complicat assegurar-se que la diferència en uns espectres són degudes a DON i no a qualsevol altre factor, com l'orientació. No obstant, un fet tranquil·litzador és que aquest efecte orientació no es veu reflectit quan escanegem plaques de petri amb multitud de grans. En aquest cas no importa l'orientació dels grans ja que es suposa que aquest efecte es veu compensat per les variacions en tots els grans. La Figura 30 demostra que en plaques de petri l'orientació dels grans no té cap tipus d'efecte.

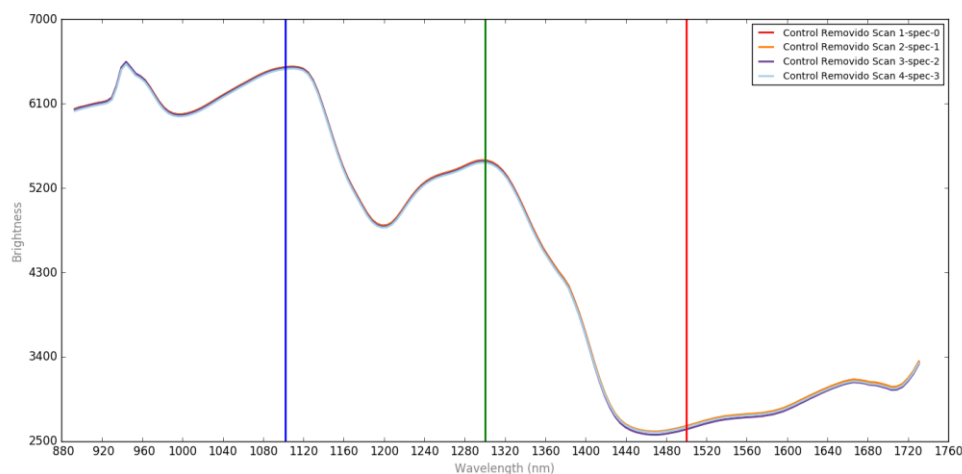


Figura 30. Espectres de grans amb diferent orientació.

Àrea de selecció

L'àrea de selecció de les mostres és determinant a l'hora d'obtenir els espectres. De píxel a píxel la variació dels espectres pot ser molt gran, però també d'àrea en àrea dins d'una mateixa mostra. Per això volíem saber a partir de quina dimensió d'àrea dins d'una mateixa placa podíem obtenir espectres similars. La Figura 31 mostra la gran variabilitat d'espectres que pot haver agafant els espectres dels quadrants 1/16. Tots els espectres estan al voltant de l'espectre mig que és l'obtingut per l'àrea de selecció més gran. Tot i així hi pot haver algun espectre que s'allunyi molt dels altres com el 2Q4. Per tant, depenent de quina zona de la placa de petri

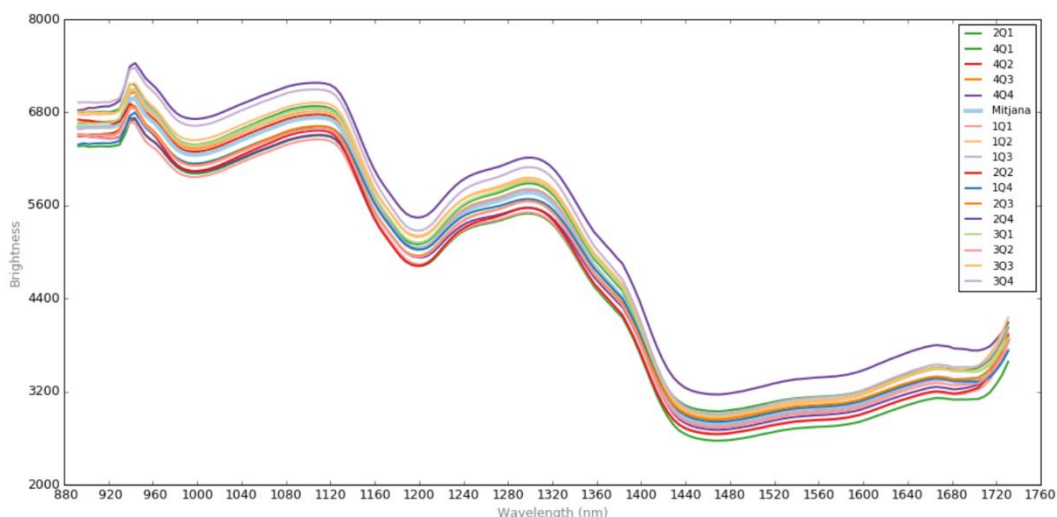


Figura 31. Espectres dels quadrants 1/16 i de l'àrea gran.

seleccionem tindrem uns espectres o uns altres ja que dins la pròpia placa hi ha una gran variabilitat. Les proves demostren que la variació segons els quadrant seleccionat és major o menor depenent de quina mostra seleccionem. Algunes presenten major variació i altres menys, però totes presenten variació. Un dels principals problemes d'aquesta variabilitat segons l'àrea

de selecció és que en algunes plaques que són molt diferents entre elles, depenent de la àrea seleccionada, els espectres d'aquestes poden coincidir entre elles. En la Figura 32 es mostren els espectres dels vint-i-un quadrants de tres mostres diferents entre ells. Els tres colors corresponen cadascun a una mostra diferent.

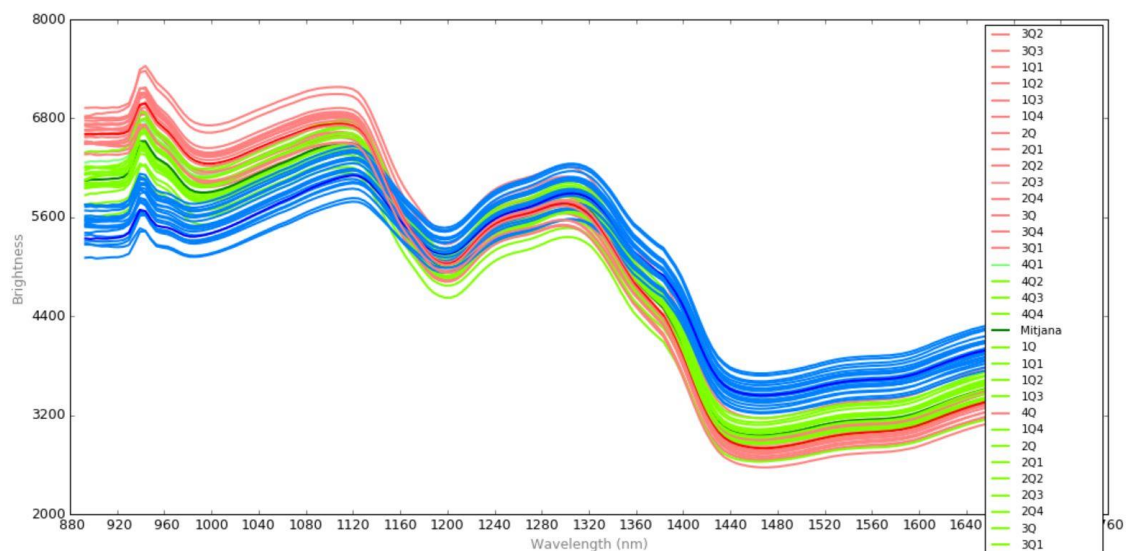


Figura 32. Espectres dels quadrants de tres mostres diferents.

Si comparem els espectres dels quadrants 1/4, en la Figura 33 podem veure que la diferència entre els espectres es redueix, tot i així encara es bastant important. És per aquesta raó que vam decidir finalment que el millor és agafar directament el major quadrat possible de la placa, d'aquesta manera englobem el màxim de mostra i així obtenim l'espectre més representatiu possible. El cas ideal seria agafar l'eina de selecció en llaç per seleccionar tota la placa de petri, però per estalviar feina creiem suficient seleccionant un quadrat el més gran possible.

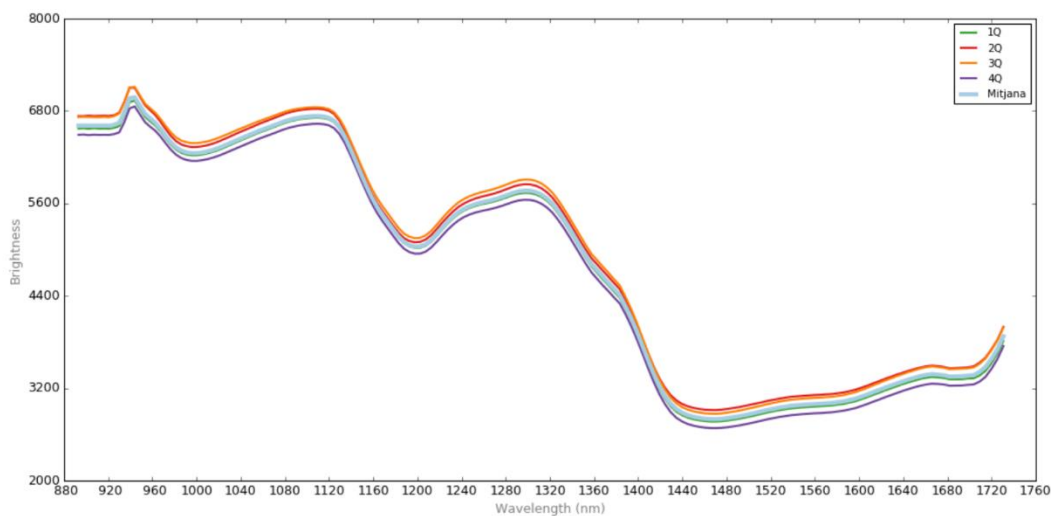


Figura 33. Espectres dels quadrants 1/4 i de l'àrea gran.

Repetibilitat

Finalment, queda la repetibilitat de l'equip. La vam dividir en repetibilitat entre diferents dies i dins del mateix dia. Si comencem comparant entre els espectres de diferents dies, la Figura 34 ens mostra que la repetibilitat és molt bona i pràcticament els espectres són els mateixos. Els intervals dels espectres on hi ha una major diferència és als dos extrems, que són punts on acostuma a haver errors i soroll en els espectres ja que es troben en els límits de la longitud

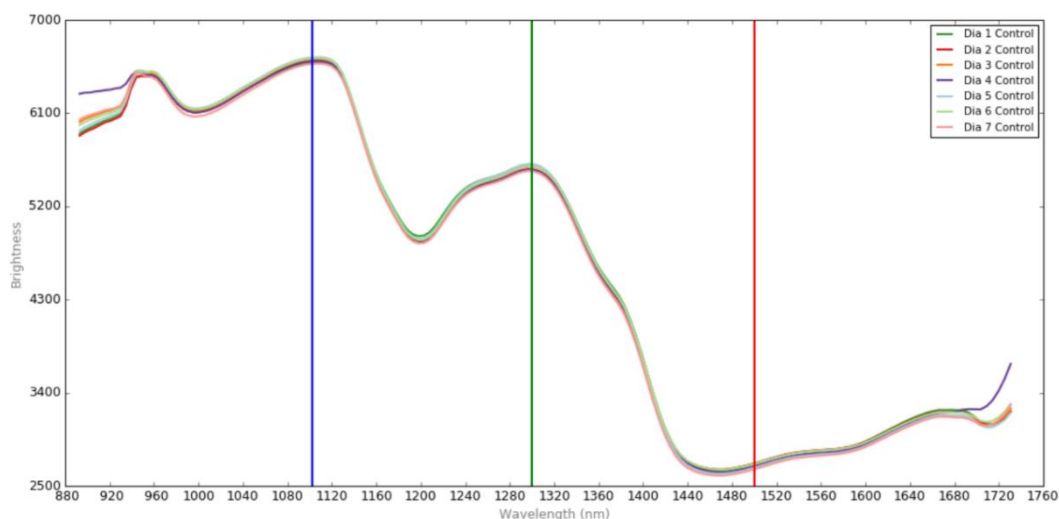


Figura 34. Espectres per provar la repetibilitat d'una mateixa mostra entre diferents dies.

d'ona que comprèn el HSI-NIR. Per tant, es pot considerar que la repetibilitat entre diferents dies és bastant bona. En quant a la repetibilitat dels espectres dins d'un mateix dia, és també molt bona ja que els espectres surten gairebé iguals tal i com es pot observar en la Figura 35. En aquest cas gairebé no hi ha diferències tampoc en els extrems dels espectres, per tant, sembla que aquestes variacions als extrems són més pronunciades al comparar espectres entre diferents dies. Això podria ser degut a petites variacions al calibrar l'equip d'un dia a l'altre.

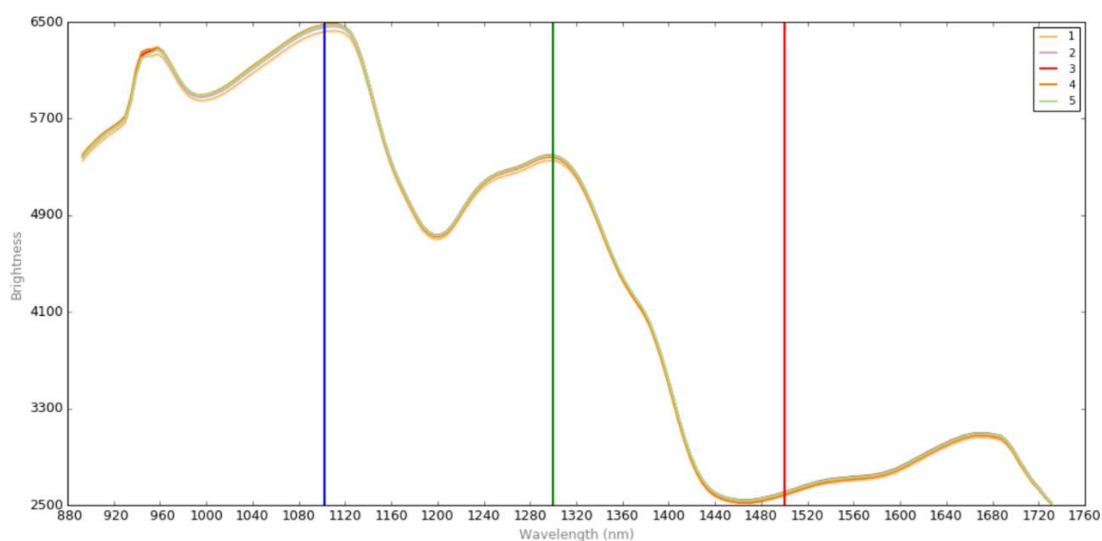


Figura 35. Espectres per provar la repetibilitat d'una mateixa mostra en diferents moments d'un mateix dia.

4.3. Capacitat del sistema HSI-NIR per determinar el nivell de DON en mostres de blat

Anàlisi espectral

Mitjançant l'escaneig de les mostres s'obtenen els espectres de cadascuna. Controlant tots els factors que poden causar variabilitat en els resultats, es pretén aconseguir determinar les diferències en els espectres causades pels diferents nivells de contaminació per DON. Però, malauradament, el DON es troba en concentracions molt baixes i per tant és molt més complicat determinar aquestes diferències.

Els espectres obtinguts s'han separat segons el tipus de mostra que es tracta, ja que la matriu alimentària és diferent pel que fa a la reflectància, entre el blat i el segó, i fins i tot, entre el blat inoculat i el contaminat naturalment. El blat inoculat tenia una aparença externa que el permetia diferenciar clarament del natural i aleshores tampoc es podia comparar correctament amb el natural. Per tant, els espectres es van separar segons si eren de blat inoculat, de blat contaminat naturalment o de segó de blat.

Els espectres obtinguts del blat inoculat es mostren en la Figura 36.

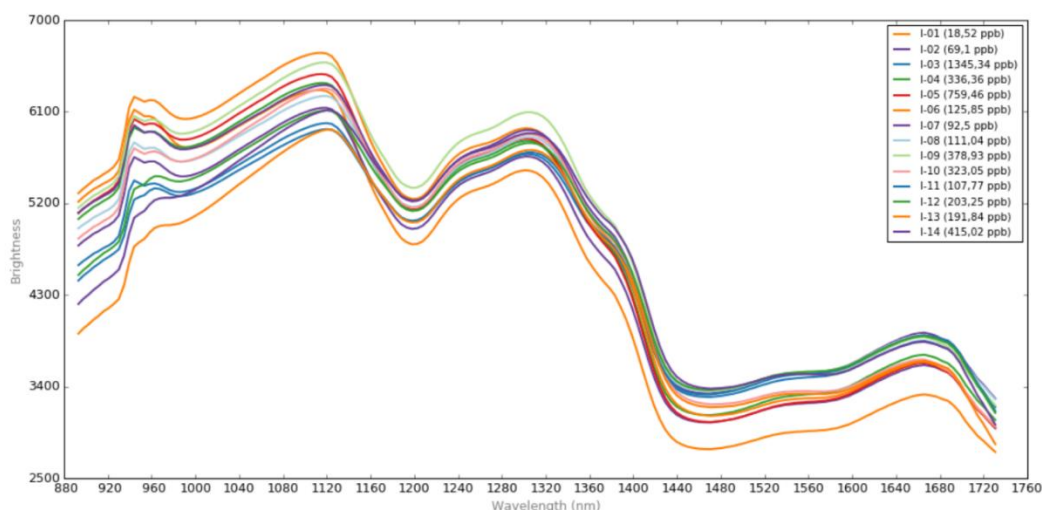


Figura 36. Espectres de les mostres de blat inoculat.

Tal i com es pot observar, els espectres tenen una forma molt similar entre ells però estan situats més amunt o més a baix. Sembla que no segueixen cap tendència relacionada amb la contaminació per DON. Tot i que l'espectre (I-01), situat a sota, és el que menor concentració de DON té, els de més a dalt de tot no coincideix amb els que major concentració tenen. De fet, el que té la segona concentració més elevada es troba bastant a baix. D'aquesta forma sembla que no es poden extreure conclusions clares a partir dels espectres en relació al nivell de contaminació per DON.

En quant als espectres obtinguts de les mostres de blat naturalment contaminat, es poden veure en la Figura 37.

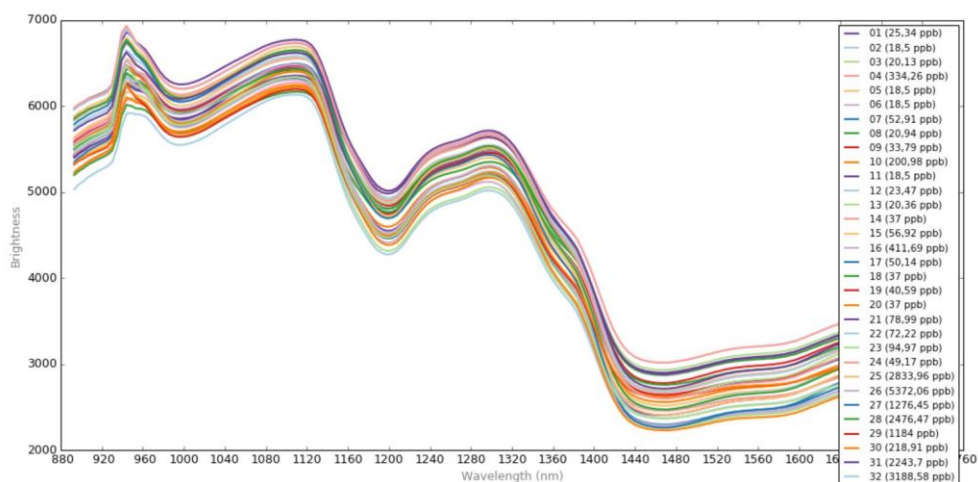


Figura 37. Espectres de les mostres de blat naturalment contaminat.

Igual que passa amb els espectres del blat inoculat, segueixen una tendència similar entre ells però alguns més a munt i altres més a baix. Totes les mostres són de blat, per tant és d'esperar que tots els espectres tinguin una forma similar ja que es tracta de la mateixa matriu. Les diferències observables en quant a les diferents posicions en quant a reflectància de cada espectre, pot ser deguda a molts paràmetres. No obstant, sembla que no és deguda a la contaminació per DON. Un dels espectres que es troba més a dalt de tots és el corresponent a la mostra 14, que només té 37 ppb. Un altre dels que està més a dalt és el de la mostra 21, que té 78,99 ppb. En canvi, entre els espectres que es troben més a baix hi ha el de la mostra 2 amb 18,5 ppb de DON i la mostra 20 amb 37 ppb. Per tant, en aquest cas en tots dos extrems verticals hi ha mostres amb baixa concentració de DON. D'aquesta manera queda clar que no hi ha cap relació aparent entre la posició de l'espectre en quant a reflectància i el nivell de contaminació.

Pel que fa al segó de blat, els espectres es mostren en la Figura 38.

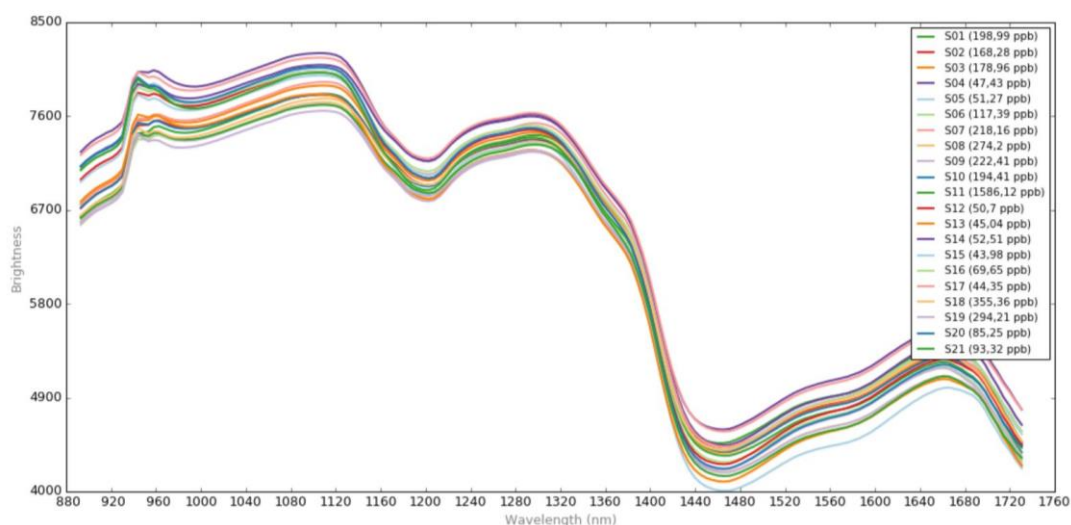


Figura 38. Espectres de les mostres de segó de blat.

S'observen uns espectres similars als altres tipus de mostres de blat. En aquest cas tampoc sembla que hi hagi cap tipus de relació entre la posició vertical del espectre i la concentració de DON. L'espectre corresponent a la mostra S11 que és la que té un major contingut de DON es troba en la zona intermèdia. En canvi, les mostres que es troben més a dalt són la S14 i la S17 que tenen 52,51 i 44,35 ppb, respectivament. I les que estan més baix de totes són les S05 i S13 que tenen 51,27 i 45,04 ppb, respectivament. Per tant, en tots dos extrems es troben mostres amb una concentració de DON molt similar.

Com a conclusió, queda clar que comparant directament els espectres de reflectància a simple vista no hi ha cap manera de poder diferenciar les mostres segons el seu nivell de contaminació per DON.

No obstant, es poden realitzar pre-tractaments a les dades com per exemple és la primera derivada. En la Figura 39 es mostren els espectres de les mostres de blat naturalment contaminat però amb el pre-tractament de primera derivada realitzat.

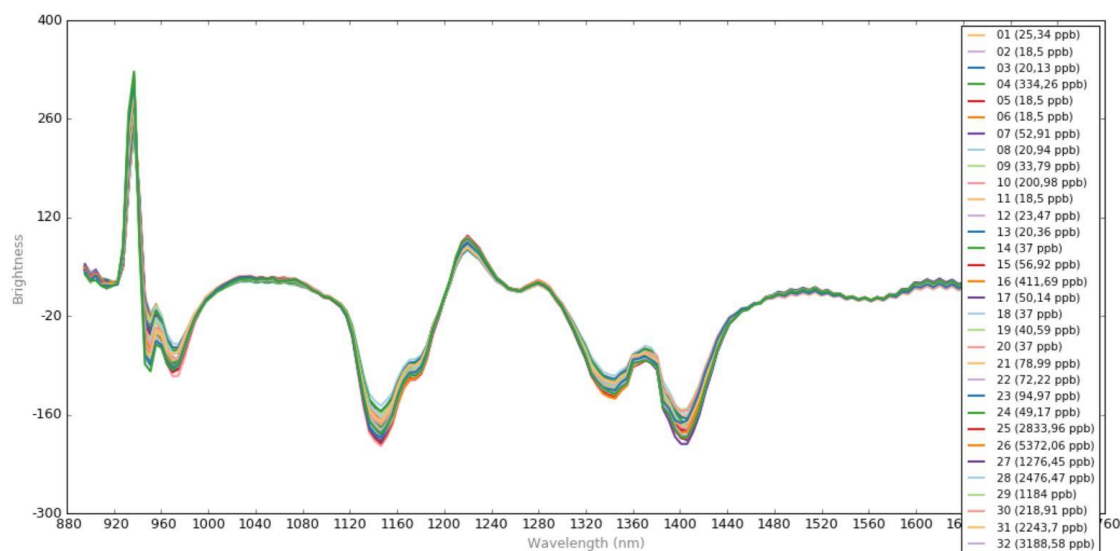


Figura 39. Espectres de les mostres de blat naturalment contaminat amb pre-tractament de primera derivada.

Tot i realitzar el pre-tractament de les dades, els espectres continuen sense ordenar-se en cap punt ni interval segons el seu nivell de contaminació. Per tant, la primera derivada no aporta cap millora aparent en la diferenciació visual dels espectres segons el DON. En el cas de les mostres de blat inoculat i segó de blat, els resultats de les Taules 1 i 2 de l'Annex aporten les mateixes conclusions que les mostres de blat naturalment contaminat.

Algun article afirma poder diferenciar entre grans sans i grans contaminats mitjançant la comparació de punts o intervals específics dels espectres. Com per exemple Peiris et al. (2009) afirmen que es poden trobar diferències en l'alçada i posició d'alguns pics de l'espectre NIR entre grans contaminats i sans. No obstant, la tècnica NIR utilitzada per Peiris et al. (2009) és diferent

a la utilitzada en aquest treball, per tant no és 100% comparable. Tot i així en la majoria d'articles es troben amb la necessitat d'analitzar les dades mitjançant programari multivariant, com per exemple Abramović et al. (2007), Liu et al. (2013) i Tekle et al. (2015), que analitzen les dades mitjançant l'ús de PLS i altres mètodes estadístics, però no mitjançant la comparació directa dels espectres.

Anàlisi multivariant

PCA

L'anàlisi de les dades mitjançant PCA tampoc permet establir cap relació entre els espectres i el DON. La Figura 40 mostra el gràfic PCA de les mostres de blat naturalment contaminat. Tot i que amb només 2 PC's s'aconsegueix explicar pràcticament el 100% de les variables X, cap dels dos PC's sembla que estigui influenciat per la concentració de DON de les mostres, ja que es troben les mostres repartides pels diferents punts del gràfic sense importar el nivell de contaminació que tenen.

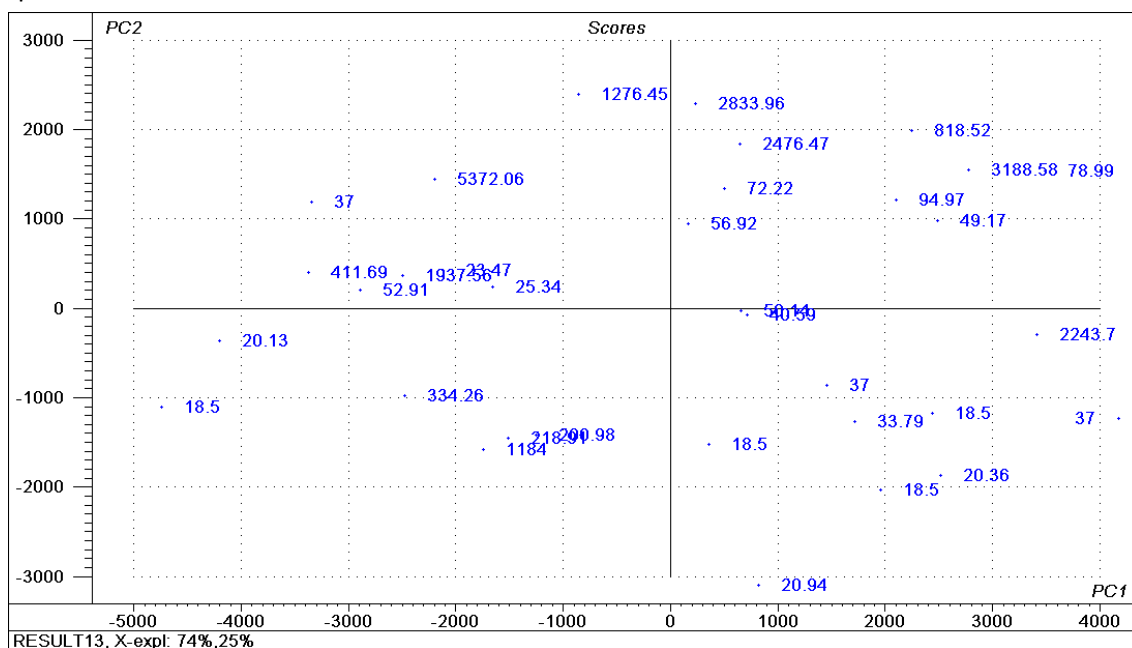


Figura 40. Gràfic PCA de les mostres de blat naturalment contaminat.

El mateix passa amb les mostres de blat inoculat i segó de blat tal i com es pot veure en la Figura 3 i Figura 4 de l'Annex. Les variables X per si soles no són suficients per explicar el DON o, el que és el mateix, el DON no és suficientment important com per influir en la reflectància enregistrada pel NIR. Tampoc millora excessivament el resultat de les gràfiques PCA en fer un pretractament de primer derivada (Figura 41A) ni segona derivada (Figura 41B) a les dades, però almenys sembla que es forma una petita agrupació amb varies mostres d'elevada concentració de DON, a diferència de les PCA de les dades sense pretractament que no mostren cap tipus

d'agrupacions. Sembla que aquesta lleugera influència del DON en les variables X s'explica mitjançant el PC1.

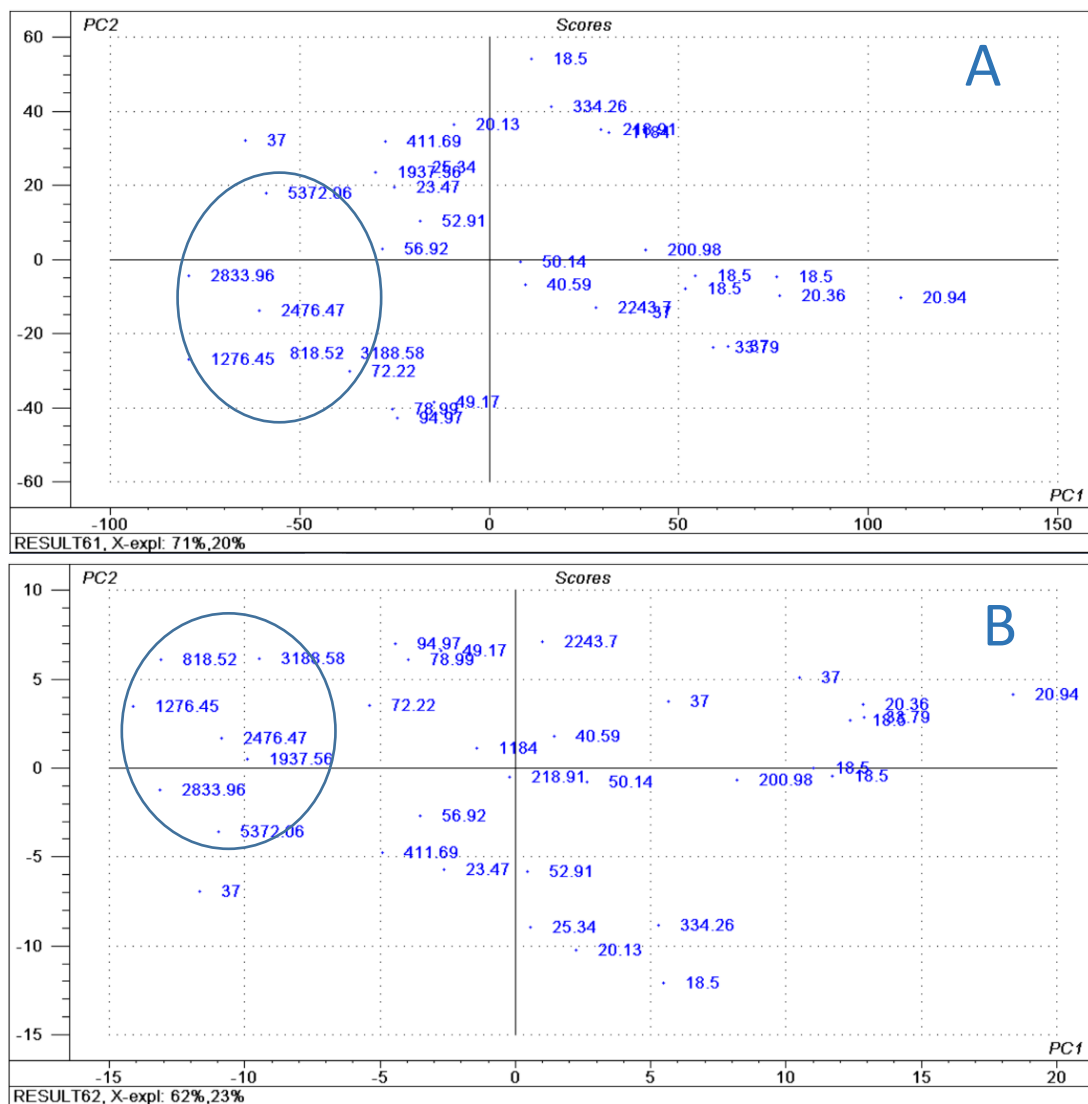


Figura 41. Gràfiques PCA de les dades del blat naturalment contaminat pretractat amb primera derivada (A) i segona derivada (B)

El mateix s'observa en el PCA del segó de blat després d'haver fet la primera (Figura 5A, Annex) i segona derivada (Figura 5B, Annex). No s'obté una PCA en la que es mostra clarament una influència d'algun PC en el nivell de DON, però almenys més o menys una part de les mostres més contaminades s'agrupa en una zona del gràfic. No obstant, el pretractament no millora els resultats en el cas del blat inoculat ja que les mostres continuen estant repartides pel gràfic sense cap tipus d'influència per part de la concentració de DON.

PLS

Degut a que l'aparença externa de les mostres de blat inoculat no es correspon a la de blat natural i que a més els resultats obtinguts no han sigut positius, s'ha optat per descartar les mostres de blat inoculat i continuar amb les de blat naturalment contaminat i segó de blat.

Els resultats obtinguts en realitzar el PLS a les mostres de blat naturalment contaminat són en un principi negatius (Figura 42). Utilitzant només 2 PC's s'explica gairebé el 100% de la variable

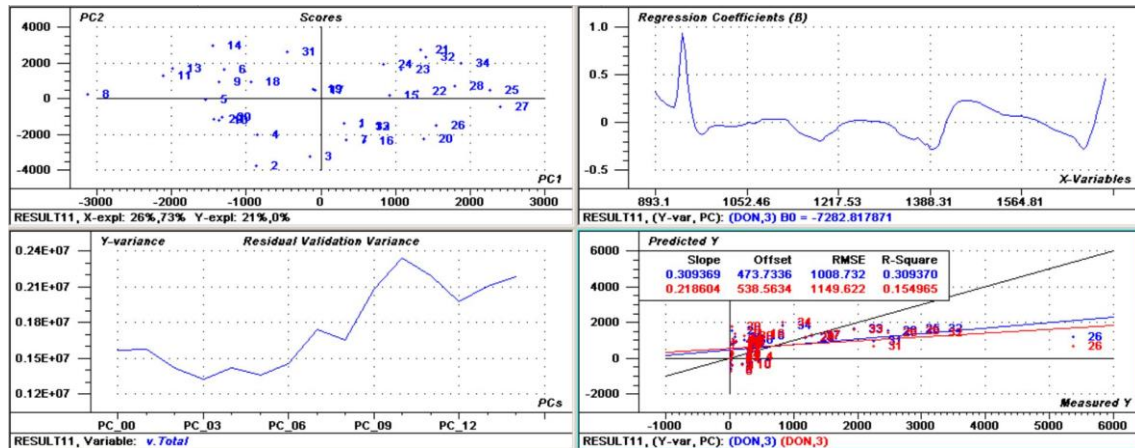


Figura 42. Resultats del PLS de les mostres de blat naturalment contaminat.

X però només un 21% de la variable Y que correspon al DON. A més, el gràfic de Y predita vs Y mesurada dona una recta de regressió molt pobre amb una pendent de 0,21, una ordenada de l'origen a 538,56, un RMSEP de 1149,62 ppb i una R^2 de només 0,154. Amb aquests resultats queda clar que el model necessita un depurat mitjançant l'eliminació de "outliers" per millorar-lo. Eliminant les mostres 26, 31 i 34 els resultats de la regressió són molt millors (Figura 43). La pendent augmenta considerablement fins arribar al 0,87 i el R^2 a 0,77. El RMSEP de 430,46 ppb continua molt elevat, però en general els paràmetres de la recta són millors.

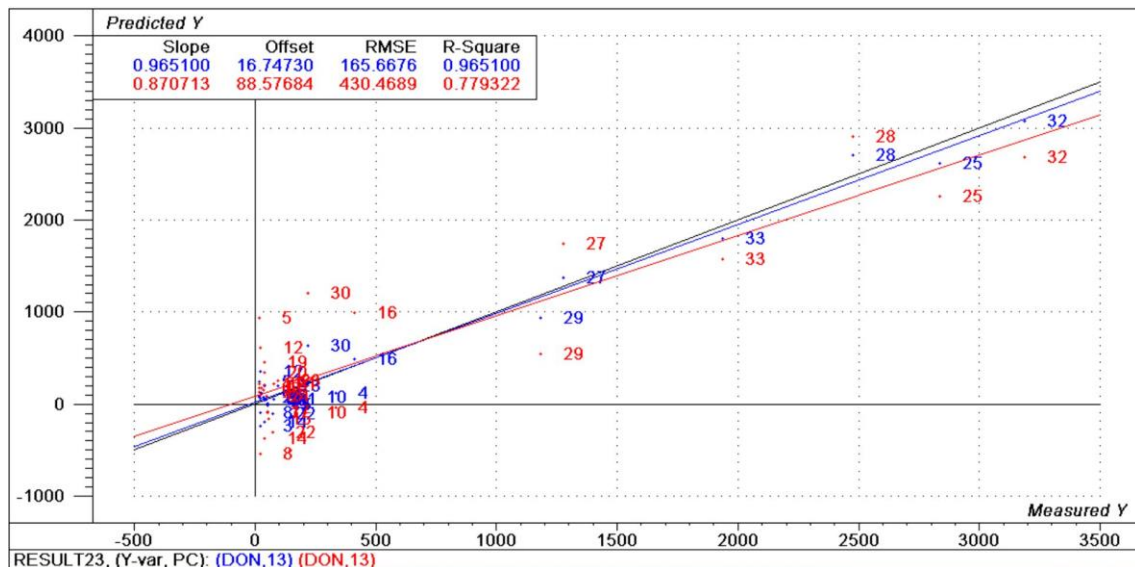


Figura 43. Resultats del PLS de les mostres de blat naturalment contaminat després d'eliminar "outliers".

Pretractant les dades amb una primera derivada, els resultats són encara millors (Figura 44). En aquest cas les mostres eliminades com a “outliers” són la 26, 30 i 34. Encara es podria depurar més el model, però es recomana eliminar un màxim del 10% de les mostres, que en aquest cas correspon a 3. La pendent és de 0,91 per tant, és superior a la pendent obtinguda en el model sense pretractament. També millora lleugerament el R^2 amb un 0,81, l'ordenada de l'origen amb un 32,44 i el RMSEP que continua sent elevat però baixa a 423,36 ppb.

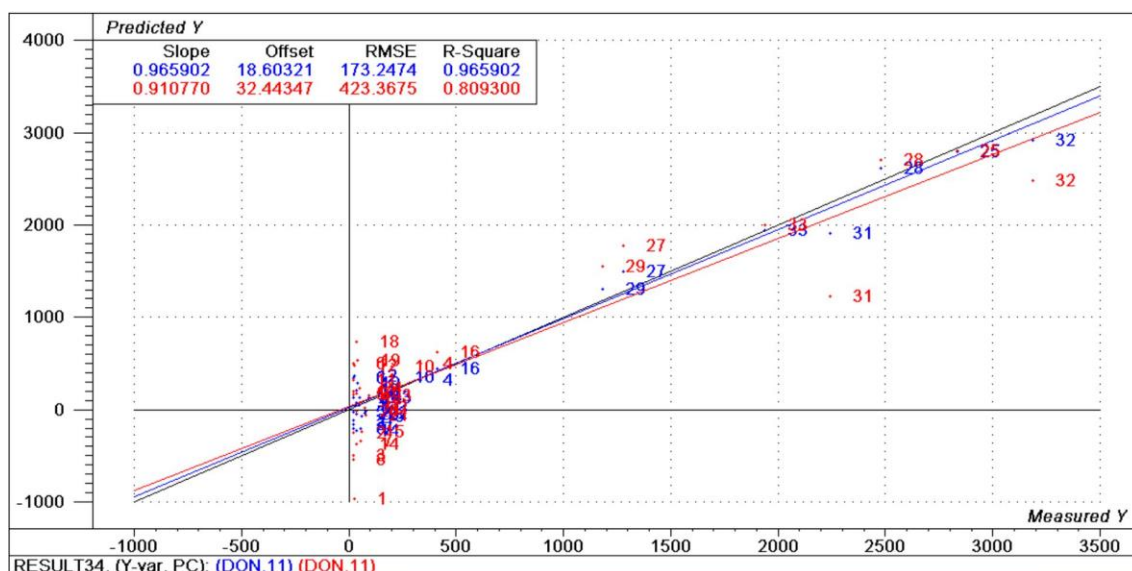


Figura 44. Resultats del PLS depurat de la primera derivada de les mostres de blat naturalment contaminat.

Pretractant les dades amb una segona derivada no millora els paràmetres de la recta respecte a la primera derivada en quant a pendent (0,87) i ordenada de l'origen (69,68) però sí que millora el RMSEP (394,23 ppb) i el R^2 (0,83)(Figura 45). No obstant, sí que millora en tot al model sense pretractar les dades. En aquest cas el model es depura eliminant les mostres 26, 30 i 34.

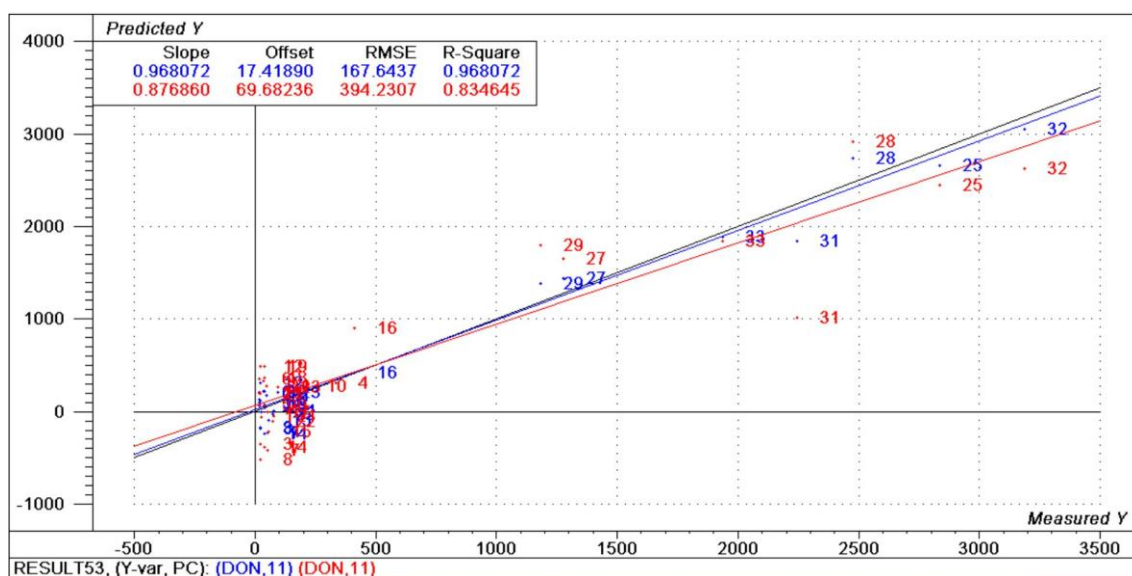


Figura 45. Resultats del PLS depurat de la segona derivada de les mostres de blat naturalment contaminat.

El pretractament de les dades, ja sigui primera o segona derivada, en fer el PLS no només millora en sí la regressió sinó que a més ho aconsegueix utilitzant un menor nombre de PC's. Per obtenir la millor recta possible sense pretractar les dades es necessiten 13 PC's, en canvi pretractant les dades es necessiten 11. Entre la primera i segona derivada, la primera és millor en la pendent i l'ordenada de l'origen en canvi la segona en el RMSEP i el R^2 .

Independentment de quin dels tres models s'elegís, els resultats serien bons ja que d'acord amb els paràmetres de la recta, permetria predir el DON d'una mostra mitjançant el seu espectre amb una certa precisió. No obstant això, si es pot elegir entre els models, la millor elecció seria elegir qualsevol dels dos models amb pretractament per davant del model sense pretractar.

Pel que fa al segó de blat, els resultats en un inici són igual de dolents que els que s'obtenen del blat naturalment contaminat (Figura 46). La variable X pràcticament s'explica al 100% amb

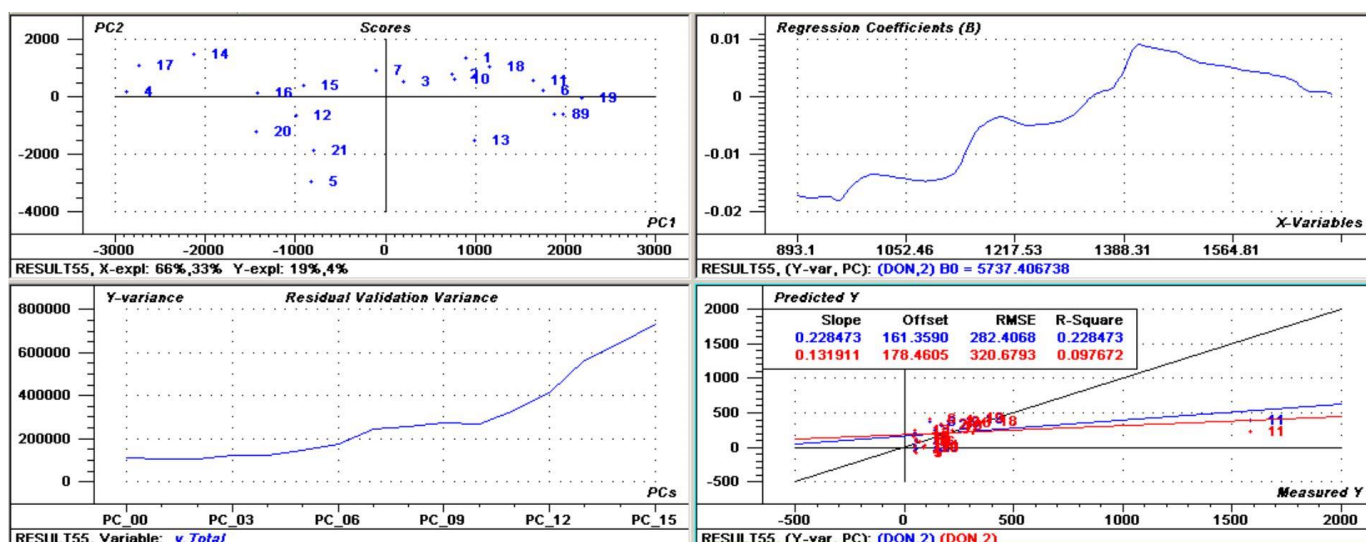


Figura 46. Resultats del PLS de les mostres de segó de blat.

només 2 PC's, però la variable Y s'explica només un 23%. Per tant, les variables s'expliquen més o menys igual que en el cas del blat naturalment contaminat. No obstant, el gràfic de la Y predita vs Y mesurada mostra una regressió molt dolenta amb uns resultats encara pitjors que els que donava el blat inicialment. La pendent és de només 0,13, l'ordenada de l'origen de 178,46, la RMSEP de 320,67 ppb i la R^2 de 0,097. En aquest gràfic es pot observar clarament que la mostra 11 espatlla completament el model.

Només eliminant aquesta mostra número 11 com a "outlier" el model millora molt (Figura 47). La variable Y amb només 2 PC's explica el 66%. A més, amb només 5 PC's, s'obté una regressió amb una pendent de 0,77, una ordenada de l'origen de 32,34, un RMSEP de 57,37 ppb i una R^2 de 0,67. No són uns paràmetres perfectes però sí que són molt millors que inicialment.

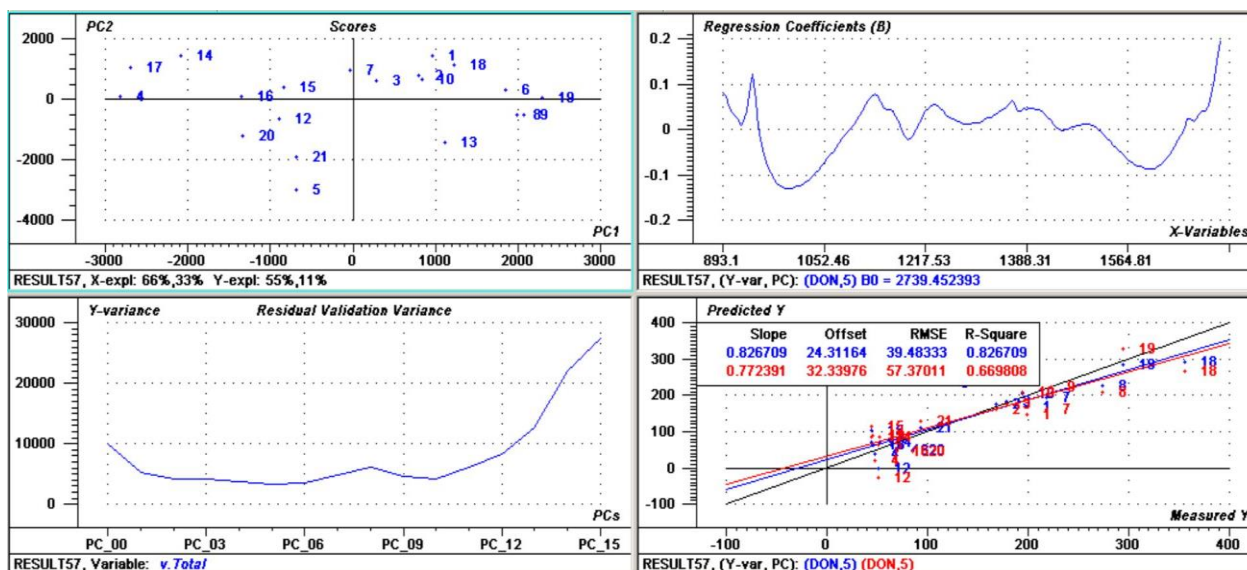


Figura 47. Resultats del PLS de les mostres de segó de blat sense la mostra 11.

Si a més es depura el model eliminant els “outliers” 6 i 7, els resultats són sorprenents (Figura 48). La pendent millora molt fins arribar a 0,96 i el R^2 a 0,89.

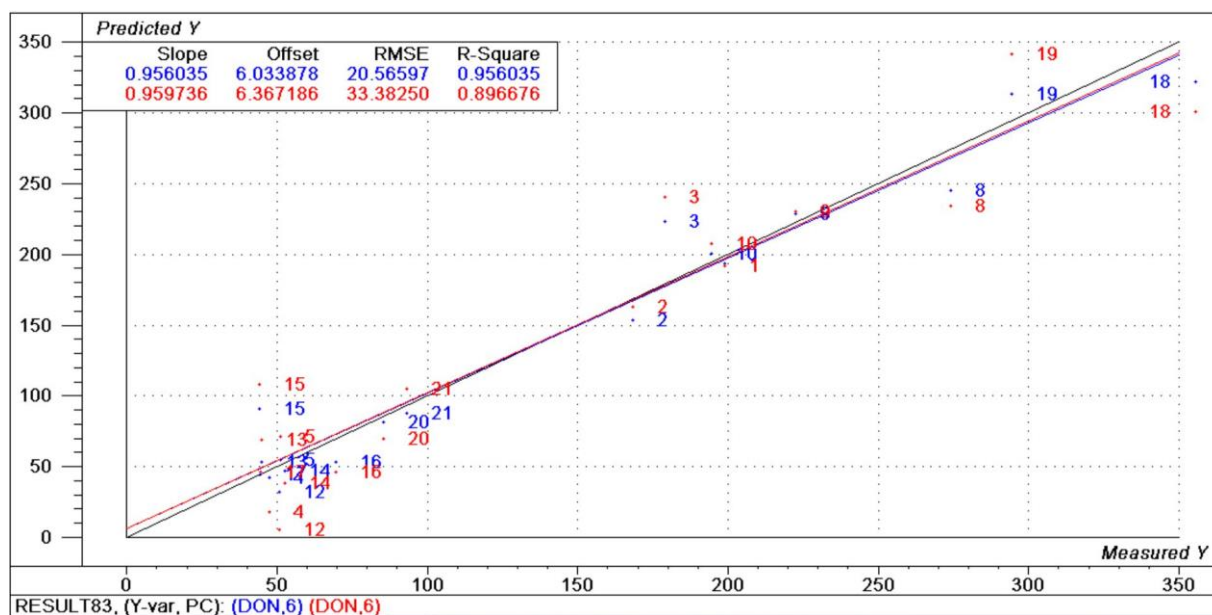


Figura 48. Resultats del PLS depurat de les mostres de segó de blat.

A diferència del blat contaminat naturalment, en aquest cas el pretractament de les dades amb la primera derivada gairebé no modifica la regressió (Figura 49). L'ordenada a l'origen disminueix a 6,22, el RMSEP a 33,13 ppb i el R^2 augmenta fins 0,89. No obstant, la pendent empitjora lleugerament al disminuir a 0,94. El depurat per aquest model també ha estat l'eliminació de les mostres 6, 7 i 11.

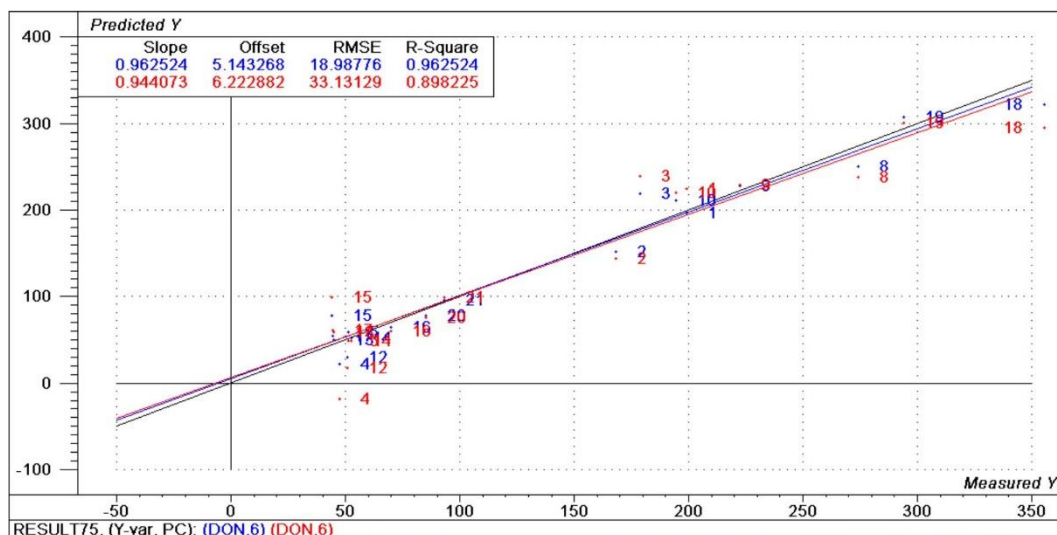


Figura 49. Resultats del PLS depurat de la primera derivada de les mostres de segó de blat.

En pretractar les dades amb una segona derivada, sorprenentment, els resultats empitjoren considerablement (Figura 50). No només en comparació a la primera derivada sinó que també en comparació al PLS de les dades sense pretractar. Si bé la pendent (0,98) i l'ordenada a l'origen (4,76) són millors, tant el RMSEP (69,73 ppb) com el R^2 (0,55) són molt pitjors. Per tant, queda clar que pretractar les dades amb una segona derivada empitjora considerablement els paràmetres de la recta en el segó de blat.

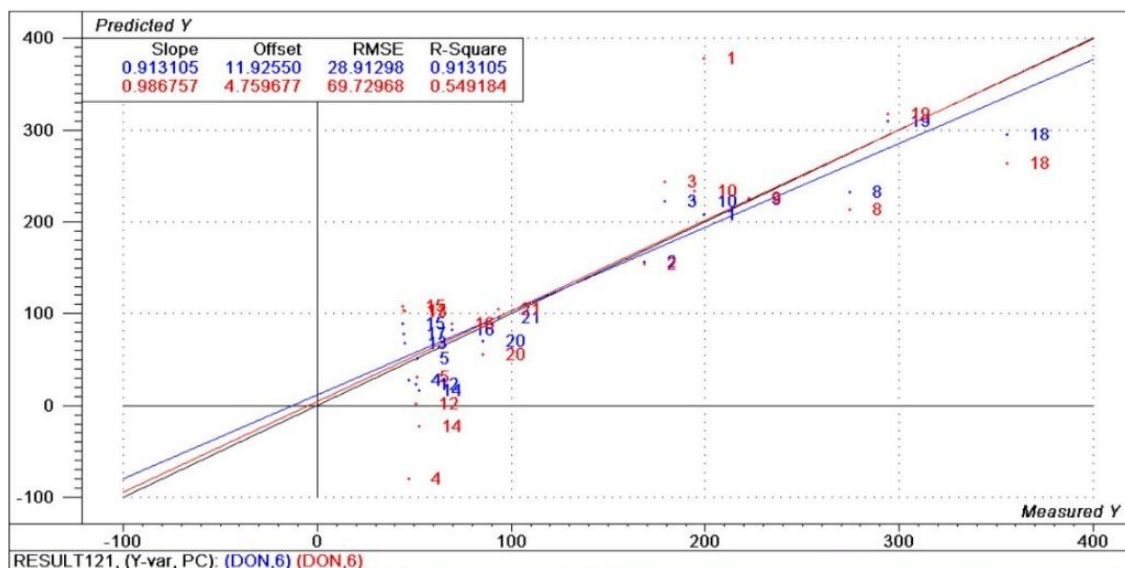


Figura 50. Resultats del PLS depurat de la segona derivada de les mostres de segó de blat.

Tot i així els resultats en el segó de blat són molt positius ja que no només els paràmetres de la recta són bons sinó que a més també s'arriba a explicar un elevat % de la variable X (99%) i també del DON (74%) amb només 2 PC's. Però el que és encara més sorprenent del model és que el rang de concentració de les mostres de segó és molt baix i tot i així és possible establir una molt bona correlació entre el DON predit i el DON mesurat utilitzant només 6 PC's. Dels tres

models el pitjor és el que s'obté amb la segona derivada, mentre que el sense pretractar i el pretractat amb primera derivada són igual de bons. Degut als bons resultats obtinguts amb el segó de blat, es va plantejar la mòlta de les mostres de blat naturalment contaminat per veure si l'efecte de la matriu és important o no en els resultats.

Els resultats del PLS de les mostres de blat mòlt són en un inici també dolents tot i que millors que els de les mostres de blat normals (Figura 51).

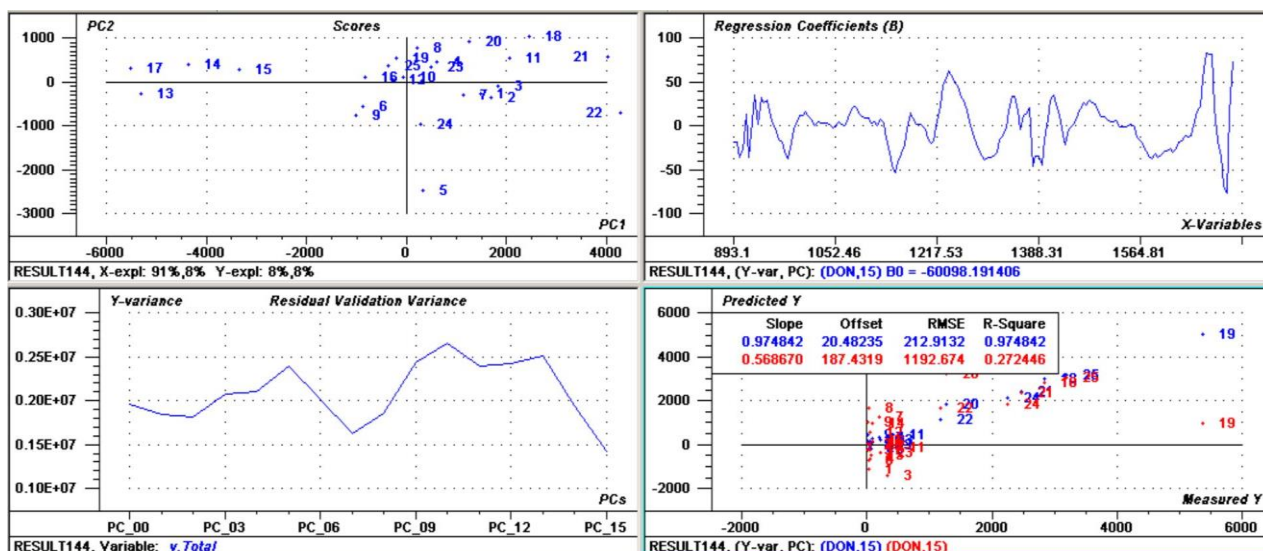


Figura 51. Resultats del PLS de les mostres de blat mòlt.

Però només amb la supressió d'una mostra (19) els resultats ja milloren considerablement (Figura 52). La pendent puja a 0,95, l'ordenada a l'origen a -21,96, el RMSEP a 436,69 ppb i el R^2 a 0,82. De fet, ja és millor que el millor model aconseguit amb el blat naturalment contaminat.

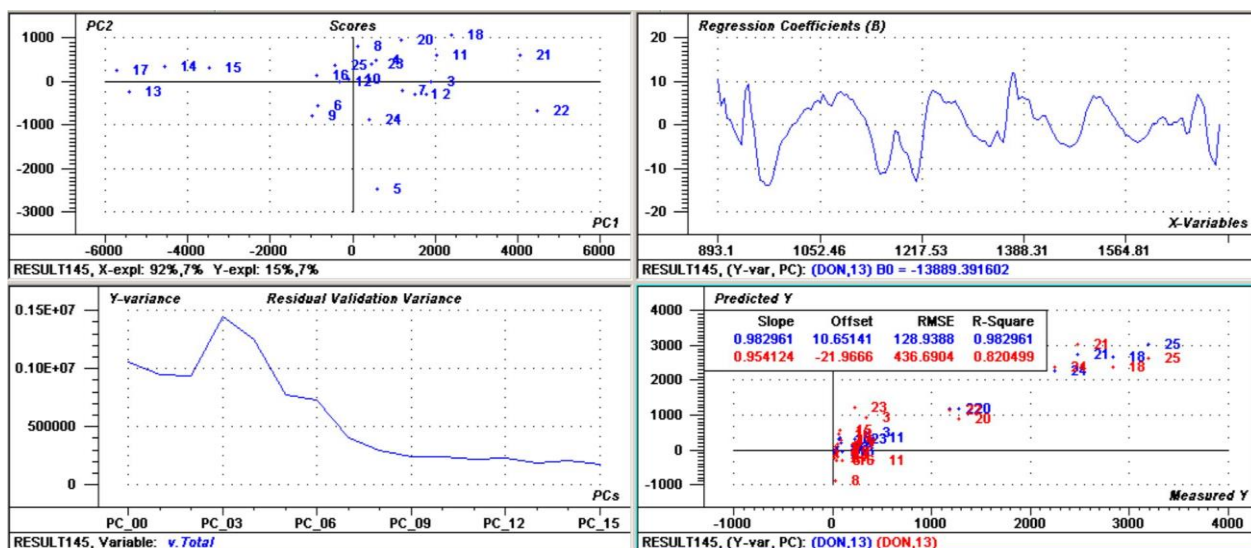


Figura 52. Resultats del PLS de les mostres de blat mòlt sense la mostra 19.

Eliminant els “outliers” 6, 13 i 18 s’aconsegueix un model amb uns paràmetres de la recta molt bons (Figura 53). La pendent després de depurar és de 0,94, una mica pitjor que el model sense depurar. No obstant, l’ordenada a l’origen (2,63), el RMSEP (210,21 ppb) i el R^2 (0,95) són excel·lents. Per tant, els resultats del blat mòlt són millors que els del blat normal i, per tant, queda clar que l’efecte matriu existeix i perjudica lleugerament la regressió.

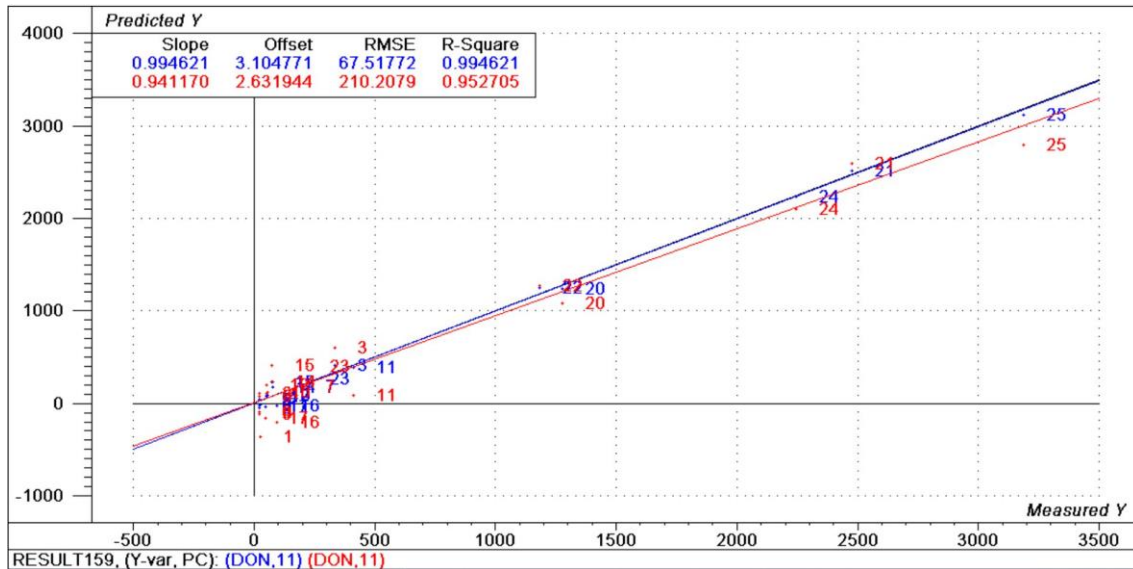


Figura 53. Resultats del PLS depurat de les mostres de blat mòlt.

Al realitzar la primera derivada de les dades, els paràmetres de la recta són també molt bons però no milloren a excepció de la pendent (0,96) (Figura 54). Els altres paràmetres són bons però en comparació al model sense pretractament són pitjors. No obstant, sí que són millors que els que s’obtenen del blat sense mòlta. El més positiu del pretractament és que els resultats observats s’obtenen només eliminant la mostra 19. A més, s’aconsegueix amb només 9 PC’s.

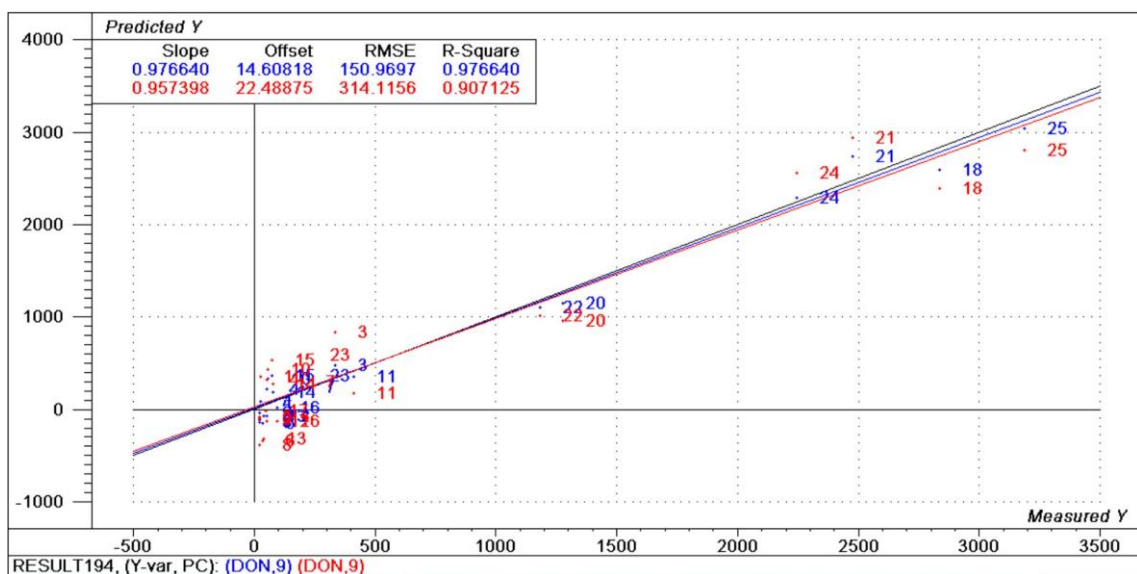


Figura 54. Resultats del PLS de la primera derivada de les mostres de blat mòlt.

Pel que fa a la segona derivada, no millora en cap aspecte la primera derivada. L'única millora respecte al PLS sense pretractar és que eliminant només la mostra 19 s'aconsegueix una millor regressió fent servir 10 PC's. No obstant, tot i depurar el model, no s'arriba a millorar els resultats que s'obtenen mitjançant el PLS de les mostres sense derivar. De totes maneres els resultats són bons ja que la pendent és de 0,91, l'ordenada a l'origen de 20,87, el RMSEP de 337,1 ppb i el R^2 de 0,89 (Figura 55).

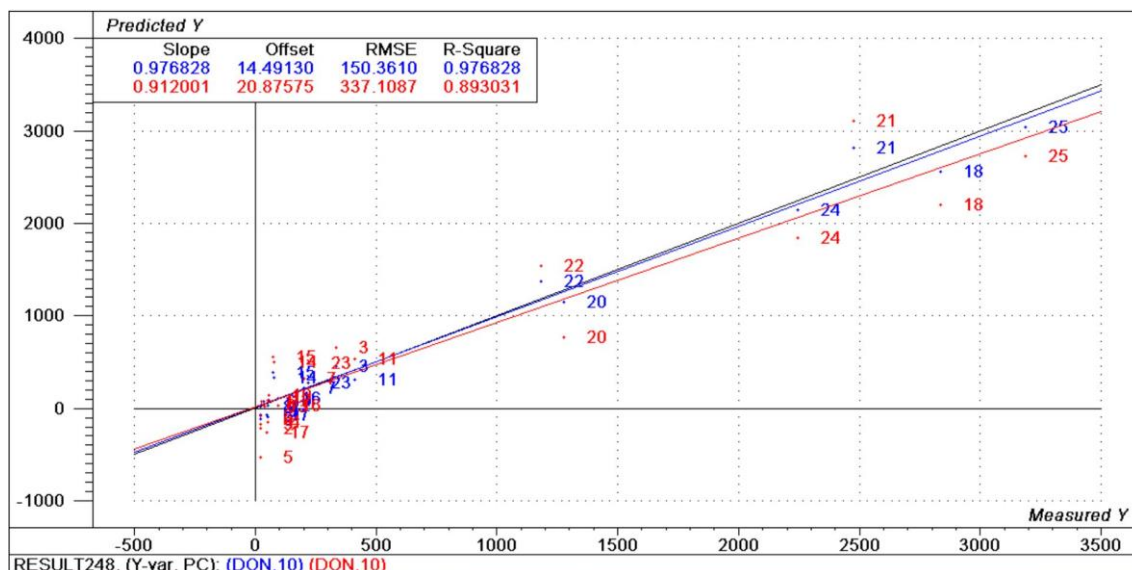


Figura 55. Resultats del PLS de la segona derivada de les mostres de blat mòlt.

La mòlta del blat sembla que facilita i millora la correlació entre el DON predit i el mesurat ja que permet obtenir uns millors resultats sense la necessitat de depurar el model en excés i a més utilitzant un menor nombre de PC's.

D'acord amb tots els resultats obtinguts, es pot concloure que els pretractaments en alguns casos milloren lleugerament els models tot i que en alguns casos, els de segona derivada, els empitjoren. Aquesta conclusió és contrària a la de la PCA en la que sí sembla que els pretractaments clarament la milloren. Per tant, els millors models en general són els que s'obtenen amb les dades pretractades amb la primera derivada tot i que els que no estan pretractats també són bons. Aquests models permeten predir la concentració de DON en una mostra a partir del seu espectre amb una bona exactitud i precisió.

El millor model obtingut en quant a paràmetres de la recta és el que s'ha obtingut mitjançant el PLS depurat de les mostres de blat mòlt. Tenint en compte les limitacions en la quantitat de mostres, el baix nivell de DON en les mostres, la distribució de les mostres en quant a concentració de DON, les desavantatges de la ELISA i la poca informació d'estudis aplicant el HSI-NIR en la detecció de DON, els resultats obtinguts en les regressions són bons. De totes formes, els resultats corresponen a les mostres de blat mòlt però l'objectiu principal del treball és sobre

mostres de blat natural. Si es planteja com una alternativa a LSD o ELISA, el model de blat molt seria completament vàlid. Però d'acord amb el que són estrictament els objectius del treball el millor model obtingut és el que correspon al PLS depurat de les mostres de blat naturalment contaminat i pretractat amb primera derivada (Figura 44). En comparació a altres estudis, els resultats són similars als que Tekle et al. (2015) descriuen en el seu estudi amb el HSI-NIR per detectar DON en civada, en el qual van aconseguir establir una R entre DON predit i mesurat de 0,8 (Tekle et al., 2015). De Girolamo et al. (2009) utilitzant un FT-NIR van obtenir uns models amb una pendent de 0,62, un RMSEP de 348 ppb i un R^2 de 0,63. Els nostres resultats són considerablement millors que els van aconseguir De Girolamo et al. (2009), no obstant això cal aclarir que els van obtenir utilitzant només 4 PC's (De Girolamo et al., 2009). Pettersson et al. (2003) van aconseguir una bona regressió entre DON predit i mesurat en blat amb una pendent de 0,949, una ordenada a l'origen de 73,83, un RMSEP de 381 ppb i un R^2 de 0,984 utilitzant 11 PC's. No obstant s'ha de tenir en compte que van fer servir un NIR sense HSI, per tant, no és 100% comparable. També van disposar de un major nombre de mostres i amb un interval de contaminació per DON més ampli. A més, la determinació de la concentració de DON de les mostres les van fer amb HPLC-GC que és més fiable que el ELISA (Pettersson et al., 2003).

Classificació

Gran part dels treballs realitzats en aquest àmbit es decanten per la classificació de les mostres en dos o tres nivells de contaminació en comptes de per la predicció del nivell concret, donat que és una opció menys exigent. De Girolamo et al. (2014) partien d'unes condicions que semblen ser bastant idònies, ja que tenien una gran quantitat de mostres (500) amb un ampli rang de concentracions de DON (≤ 50 a 16,000 ppb), un equip FT-NIR i totes les concentracions de les mostres analitzades per HPLC. Tot i així, van aconseguir un PLS amb una pendent de 0,691, una ordenada a l'origen de 695, un RMSEP de 1977 ppb i un R^2 de 0,63. Principalment degut al RMSEP de 1977 ppb, superior al límit màxim permès per la UE, De Girolamo et al. (2014) van decidir que el millor era classificar i no predir (De Girolamo et al., 2014).

En el nostre cas, les mostres de blat s'han classificat segons si la contaminació per DON supera (>1250 ppb) o no (≤ 1250 ppb) el límit màxim legal i també en tres grups (A (< 200 ppb), B (≥ 200 i ≤ 1250 ppb) i C (>1250 ppb)) segons el nivell de contaminació. Pel que fa al segó, només una mostra supera el límit reglamentari però es considera un "outlier", per tant no s'ha fet classificació segons el límit reglamentari (750 ppb). Però sí que s'ha fet segons el nivell de contaminació (A (< 100 ppb), B (≥ 100 i ≤ 200 ppb) i C (>200 ppb)). La classificació s'ha dut a terme

amb les dades prèviament pretractades amb una primera derivada i també sense pretractament.

Els resultats de la classificació de les mostres de blat segons sí compleixen o no el límit màxim legal són molt bons (Taula 12).

Taula 12. Matriu de classificació de les mostres de blat segons el límit màxim legal.

Sense pretractar		Predit		Concordança	Primera Derivada		Predit		Concordança
Blat Natural		NO	SI	94,12%	Blat Natural		NO	SI	97,06%
Real	NO	24	2		Real	NO	25	1	
	SI	0	8			SI	0	8	
Sense pretractar		Predit		Concordança	Primera Derivada		Predit		Concordança
Blat Mòlt		NO	SI	84%	Blat Mòlt		NO	SI	100%
Real	NO	14	4		Real	NO	18	0	
	SI	0	7			SI	0	7	

Tant el blat natural (94,12%) com el blat mòlt (84%) obtenen una concordança molt bona en la classificació sense la necessitat de pretractar les mostres. En pretractar les mostres amb una primera derivada la concordança de la classificació encara millora més obtenint un 97,06% en el blat natural i un 100% de concordança pel blat mòlt. A més, és positiu el fet de que els errors en la classificació es tracten de falsos positius, per tant, en cap cas s'estan classificant com a bones mostres que superen el límit màxim legal. D'aquesta manera, d'acord amb l'elevada concordança de la classificació de les mostres, es podria separar les mostres a l'entrada a fàbrica segons si compleixen o no amb el reglament.

En quant a la classificació en tres grups segons el nivell de contaminació per DON, els resultats es mostren en la Taula 13. Els resultats també són molt bons. Sense la necessitat de pretractar les mostres, la concordança del blat natural (91,18%), el blat mòlt (88%) i del segó de blat (95%)

Taula 13. Matriu de classificació de les mostres segons el nivell de contaminació per DON.

Sense pretractar		Predit			Concordança	Primera Derivada		Predit			Concordança
Blat Natural		A	B	C	91,18%	Blat Natural		A	B	C	100%
Real	A	20	1	0		Real	A	21	0	0	
	B	0	4	1			B	0	5	0	
	C	0	1	7			C	0	0	8	
Sense pretractar		Predit			Concordança	Primera Derivada		Predit			Concordança
Blat Mòlt		A	B	C	88%	Blat Mòlt		A	B	C	100%
Real	A	12	1	1		Real	A	14	0	0	
	B	0	4	0			B	0	4	0	
	C	0	1	6			C	0	0	7	
Sense pretractar		Predit			Concordança	Primera Derivada		Predit			Concordança
Segó de Blat		A	B	C	95%	Segó de Blat		A	B	C	100%
Real	A	10	0	0		Real	A	10	0	0	
	B	0	4	1			B	0	5	0	
	C	0	0	6			C	0	0	6	

és molt elevada. En pretractar les mostres amb una primera derivada la classificació és perfecta arribant a una concordança del 100% per tots tres tipus de mostres. En aquest cas el blat natural i el blat mòlt sense pretractar sí que presenten falsos negatius ja que classifiquen cadascun una mostra del tipus C com a tipus B, per tant, estan classificant una mostra superior al límit legal màxim (>1250 ppb) com una mostra que té un nivell de contaminació entre 200 i 1250 ppb. No obstant, al pretractar les mostres aquest error desapareix. Gràcies a aquesta elevada concordança en la classificació de les mostres depenent del nivell de contaminació per DON, es podrien separar les mostres segons la qualitat que presenten i així destinar-les per diferents fins.

S'ha de tenir en compte que el que es mesura és la concordança i classificació de les mateixes mostres amb què es genera el model de classificació. Caldria tenir mostres independents per a validar la capacitat del model de classificació pel que fa a la discriminació de les mostres en la realitat. Per tant, els resultats presentats poden donar una visió més positiva del que en realitat és. Per validar, es necessitaria un altre conjunt de mostres que s'utilitzarien només per classificar i validar el model, però no per crear-lo.

Barbedo et al. (2017) utilitzant un equip HSI-NIR afirmen arribar a concordançes del 72% i del 81% per classificacions de tres i dos classes, respectivament. La classificació de tres es basa en tres grups (Classe 1 (≤ 500 ppb), Classe 2 (>500 i ≤ 1250 ppb) i Classe 3 (>1250 ppb)) segons el nivell de contaminació per DON i la classificació de dos en dos grups depenent de si les mostres superen (>1250 ppb) o no (≤ 1250 ppb) el límit màxim legal. Tots dos tipus de classificacions són semblants a les emprades en aquest TFM, no obstant això, els nostres resultats no estan validats amb mostres independents en canvi en l'estudi de Barbedo et al. (2017) sí. Només considerant el blat normal i sense pretractar les mostres, nosaltres aconseguim una concordança del 94,12% en la classificació de dos grups i un 91,18% en la dels tres grups, en canvi Barbedo et al. (2017) aconseguixen un 81% i un 72%, respectivament (Barbedo et al., 2017).

De Girolamo et al. (2014), en aquest cas amb un FT-NIR, afirmen classificar les mostres amb un 75% de concordança en tres grups (A (≤ 1000 ppb), B (<1000 i ≤ 2500 ppb) i C (>2500 ppb)) segons el nivell de contaminació. Degut a la gran quantitat de mostres i l'elevada contaminació d'aquestes, la classificació la realitzen segons uns nivells més elevats que en el nostre treball. De Girolamo et al. (2014) aconseguixen una concordança del 90% en classificar mostres segons si superen els 1200 ppb de DON o no. En aquest cas s'apropen a la nostra concordança en blat normal (94,12% sense pretractament; 97,06% amb pretractament) però no la superen en cap cas. S'ha de tenir en compte que en el seu estudi validen la classificació amb mostres independents, en canvi en el nostre estudi no (De Girolamo et al., 2014).

5. Conclusions

En aquest treball final de màster s'ha posat a prova el HSI-NIR per determinar la seva capacitat per detectar el DON en mostres de blat i s'ha deduït que no només és possible sinó que a més es pot fer amb bons resultats. Els models de predicció creats mitjançant PLS permeten predir la concentració de DON en una mostra a partir de l'espectre obtingut amb l'equip HSI-NIR. El millor model creat correspon a l'obtingut amb les mostres de blat molt. Té una pendent de 0,94; ordenada a l'origen de 2,63; RMSEP de 210,21 ppb i un R^2 de 0,95. Aquests paràmetres són excel·lents sobretot tenint en compte que el DON és un component que es troba en concentracions molt baixes i, per tant, en un principi és difícil de detectar amb NIR. No obstant això, la regressió demostra que aquest model permet predir la concentració de DON amb certa precisió. Nogensmenys, el model que més concorda estrictament amb l'objectiu principal del treball és l'obtingut a partir de les mostres de blat naturalment contaminat. En aquest cas el millor model té una pendent de 0,91; R^2 de 0,81; ordenada de l'origen de 32,44 i un RMSEP de 423,36 ppb. No és tant bo com l'obtingut de les mostres de blat molt degut a l'efecte de la matriu, però presenta una bona correlació i per això hauria de permetre predir el DON. A més de la predicció de DON, el HSI-NIR també ens permet classificar les mostres segons el nivell de DON o segons si superen un líndar específic amb una concordança superior al 90%.

En l'actualitat no existeix cap tècnica d'anàlisi que permeti monitoritzar el DON de forma continua durant l'entrada de blat a fàbrica per determinar la seva qualitat. Per aquesta raó s'investiga les possibilitats d'un equip HSI-NIR amb l'objectiu de poder predir la concentració de DON en mostres de blat de forma ràpida i no destructiva. El correcte funcionament d'aquest equip permetria analitzar contínuament el blat a l'entrada a fàbrica i d'aquesta forma poder discriminar entre mostres que compleixen o no el límit legal màxim i fins i tot poder distingir el blat segons la seva qualitat.

La valoració global dels resultats obtinguts al llarg del treball és molt positiva i més encara si es té en compte les limitacions. De cara a un pròxim projecte per continuar investigant sobre aquest tema hi ha sobretot dos aspectes a millorar i a tenir en compte des d'un principi. Primer de tot, s'hauria de disposar d'una major quantitat de mostres de blat i sobretot que la distribució de les mostres en quant al nivell de contaminació per DON estigui equilibrada. I l'altre aspecte important a tenir en compte és utilitzar el HPLC com a tècnica per determinar la concentració de DON de les mostres de blat en comptes de l'ELISA. És molt important que el DON que es determina mitjançant la tècnica d'anàlisi sigui el més exacte possible ja que aquesta concentració és la que posteriorment s'assigna al seu corresponent espectre. Si el DON no es

determina amb exactitud, s'estaria assignant una concentració errònia als diferents espectres i, per tant, és molt difícil crear un bon model. Tenint en compte aquests dos factors, es creu que els resultats que s'obtingrien en properes investigacions haurien de ser millors que els obtinguts en el present treball.

D'acord als resultats obtinguts en el treball i a l'espera de futures investigacions, s'ha de ser optimista en la capacitat del HSI-NIR i la seva aplicació en la indústria per millorar tant la qualitat dels aliments com la seva innocuïtat.

6. Bibliografia

- Abramović, B., Jajić, I., Abramović, B., Ćosić, J., i Jurić, V. 2007. Detection of deoxynivalenol in wheat by fourier transform infrared spectroscopy. *Acta Chimica Slovenica* 54: 859–867.
- Alshannaq, A., i Yu, J.H. 2017. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14: 632–651.
- Barbedo, J.G.A., Tibola, C.S., i Lima, M.I.P. 2017. Deoxynivalenol screening in wheat kernels using hyperspectral imaging. *Biosystems Engineering* 155: 24–32.
- Cano-Sancho, G., Valle-Algarra, F.M., Jiménez, M., Burdaspal, P., Legarda, T.M., Ramos, A.J., Sanchis, V., i Marín, S. 2011. Presence of trichothecenes and co-occurrence in cereal-based food from Catalonia (Spain). *Food Control* 22: 490–495.
- Castillo, M.Á., Montes, R., Navarro, A., Segarra, R., Cuesta, G., i Hernández, E. 2008. Occurrence of deoxynivalenol and nivalenol in Spanish corn-based food products. *Journal of Food Composition and Analysis* 21: 423–427.
- Cheli, F., Pinotti, L., Rossi, L., i Dell’Orto, V. 2013. Effect of milling procedures on mycotoxin distribution in wheat fractions: A review. *LWT - Food Science and Technology* 54: 307–314.
- Chrpová, J., Šíp, V., Sumíková, T., Salava, J., Palicová, J., Štočková, L., Džuman, Z., i Hajšlová, J. 2016. Occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in wheat grain collected in the Czech Republic. *World Mycotoxin Journal* 9: 317–327.
- Codex Alimentarius, FAO. 2016. Código de prácticas para prevenir y reducir la contaminación de los cereales por micotoxinas, CAC/RCP 51-2003. Roma, Italia.
- Comissió Europea, 2006a. Recomendación de la Comisión, de 17 de agosto de 2006, sobre la prevención y la reducción de las toxinas de *Fusarium* en los cereales y los productos a base de cereales. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 29 de agosto de 2006, núm. 234, pp 35-40.
- Comissió Europea, 2006b. Reglamento (CE) nº 1881/2006 de la Comisión, de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 20 de diciembre de 2006, núm. 364, pp 5-24.
- De Nijs, M., Rombouts, F., i Notermans, S. 1996. *Fusarium* molds and their mycotoxins. *Journal of Food Safety* 16, 15–58.
- De Girolamo, A., Cervellieri, S., Visconti, A., i Pascale, M. 2014. Rapid analysis of deoxynivalenol in durum wheat by FT-NIR spectroscopy. *Toxins* 6: 3129–3143.
- De Girolamo, A., Lippolis, V., Nordkvist, E., i Visconti, A. 2009. Rapid and non-invasive analysis of deoxynivalenol in durum and common wheat by Fourier-Transform Near Infrared (FT-NIR) spectroscopy. *Food Additives and Contaminants* 26: 907–917.
- Debouck, C., Haubruge, E., Bollaerts, P., Van Bignoot, D., Brostaux, Y., Werry, A., i Rooze, M. 2001. Skeletal deformities induced by the intraperitoneal administration of deoxynivalenol (vomitoxin) in mice. *International Orthopaedics* 25: 194–198.

- EFSA (European Food Safety Authority). 2013. Deoxynivalenol in food and feed: occurrence and exposure. *EFSA Journal* 2013 11: 3379–3434
- El-Banna, A.A., Scott, P.M., i Lau, P.Y. 1984. Formation of trichothecenes by *Fusarium solani* var. *coeruleum* and *Fusarium sambucinum* in potatoes. *Applied and Environmental Microbiology* 47: 1169–1171.
- FAO. 2002. Manual sobre la aplicación del sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas. Rome, Italy.
- Forsyth, D.M., Yoshizawa, T., Morooka, N., i Tuite, J. 1977. Emetic and refusal activity of deoxynivalenol to swine. *Applied and Environmental Microbiology* 34: 547–552.
- Fox, G., i Manley, M. 2014. Applications of single kernel conventional and hyperspectral imaging near infrared spectroscopy in cereals. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94: 174–179.
- Frisvad, J.C., Thrane, U., Samson, R.A., i Pitt, J.I. 2006. Important mycotoxins and the fungi which produce them. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 571: 3–31.
- Garcia, D., Barros, G., Chulze, S., Ramos, A.J., Sanchis, V., i Marín, S. 2012. Impact of cycling temperatures on *Fusarium verticillioides* and *Fusarium graminearum* growth and mycotoxins production in soybean. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92: 2952–2959.
- Gouze, M.E., Laffitte, J., Rouimi, P., Loiseau, N., Oswald, I.P., i Galtier, P. 2006. Effect of various doses of deoxynivalenol on liver xenobiotic metabolizing enzymes in mice. *Food and Chemical Toxicology* 44: 476–483.
- Heidtmann-Bemvenuti, R. 2011. Biochemistry and metabolism of mycotoxins: A review. *African Journal of Food Science* 5: 861–869.
- Hope, R., Aldred, D., i Magan, N. 2005. Comparison of environmental profiles for growth and deoxynivalenol production by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* on wheat grain. *Letters in Applied Microbiology* 40: 295–300.
- Hughes, D.M., Gahl, M.J., Graham, C.H., i Grieb, S.L. 1999. Overt Signs of Toxicity to Dogs and Cats of Dietary Deoxynivalenol. *Journal of Animal Science* 77: 693–700.
- Iverson, F., Armstrong, C., Nera, E., Truelove, J., Fernie, S., Scott, P., Stapley, R., Hayward, S., i Gunner, S. 1995. Chronic Feeding Study of deoxynivalenol in B6C3F1 male and female mice. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 15: 283–306.
- Ji, X., Yang, H., Wang, J., Li, R., Zhao, H., Xu, J., Xiao, Y., Tang, B., i Qian, M. 2018. Occurrence of deoxynivalenol (DON) in cereal-based food products marketed through e-commerce stores and an assessment of dietary exposure of Chinese consumers to DON. *Food Control* 92: 391–398.
- Kolf-Clauw, M., Castellote, J., Joly, B., Bourges-Abella, N., Raymond-Letron, I., Pinton, P., i Oswald, I.P. 2009. Development of a pig jejunal explant culture for studying the gastrointestinal toxicity of the mycotoxin deoxynivalenol: Histopathological analysis. *Toxicology in Vitro* 23: 1580–1584.

- Kushiro, M. 2008. Effects of milling and cooking processes on the deoxynivalenol content in wheat. *International Journal of Molecular Sciences* 9: 2127–2145
- Lauren, D.R., Di Menna, M.E., Greenhalgh, R., Miller, J.D., Neish, G.A., i Burgess, L.W. 1988. Toxin-producing potential of some *Fusarium* species from a New Zealand pasture. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 31: 219–225.
- Lee, U. S., Jang, H. S., Tanaka, T., Oh, Y. J., Cho, C. M., i Ueno, Y. 1987. Effect of milling on decontamination of *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in Korean wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 35: 126–129.
- Li, M.M., Guan, E.Q., i Bian, K. 2015. Effect of ozone treatment on deoxynivalenol and quality evaluation of ozonised wheat. *Food Additives and Contaminants* 32: 544–553.
- Liu, L., Zhao, B., Zhang, Y., i Zhang, X. 2013. Design and experiment of NIR wheat quality quick detection system. *IFIP Advances in Information and Communication Technology* 393: 135–141.
- Marín, P., Moretti, A., Ritieni, A., Jurado, M., Vázquez, C., i González-Jaén, M.T. 2012. Phylogenetic analyses and toxigenic profiles of *Fusarium equiseti* and *Fusarium acuminatum* isolated from cereals from Southern Europe. *Food Microbiology* 31: 229–237.
- Marín, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, G., i Sanchis, V. 2013. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology* 60: 218–237.
- McLachlan, A., Shaw, K.J., Hocking, A.D., Pitt, J.I., i Nguyen, T.H.L. 1992. Production of trichothecene mycotoxins by Australian *Fusarium* species. *Food Additives and Contaminants* 9: 631–638.
- McMullin, D., Mizaikoff, B., i Krska, R. 2015. Advancements in IR spectroscopic approaches for the determination of fungal derived contaminations in food crops. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407: 653–660.
- Mendes, G.R.L., Del Ponte, E.M., Feltrin, A.C., Badiale-Furlong, E., i de Oliveira, A.C. 2018. Common resistance to fusarium head blight in Brazilian wheat cultivars. *Scientia Agricola* 75: 426–431.
- Meneely, J.P., Ricci, F., van Egmond, H.P., i Elliott, C.T. 2011. Current methods of analysis for the determination of trichothecene mycotoxins in food. *Trends in Analytical Chemistry* 30: 192–203.
- Miller, J.D., Taylor, A., i Greenhalgh, R. 1983. Production of deoxynivalenol and related compounds in liquid culture by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Microbiology* 29: 1171–1178.
- Nagy, C.M., Fejer, S.N., Berek, L., Molnar, J., i Viskolcz, B. 2005. Hydrogen bondings in deoxynivalenol (DON) conformations - A density functional study. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* 726: 55–59.
- Neira, M.S., Pacin, A.M., Martínez, E.J., Moltó, G., i Resnik, S.L. 1997. The effects of bakery processing on natural deoxynivalenol contamination. *International Journal of Food Microbiology* 37: 21–25.

- Nordkvist, E., i Häggblom, P. 2014. Fusarium mycotoxin contamination of cereals and bedding straw at Swedish pig farms. *Animal Feed Science and Technology* 198: 231–237.
- Parry, D.W., Jenkinson, P., i McLeod, L. 1995. Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals—a review. *Plant Pathology* 44: 207–238.
- Peiris, K.H.S., Dong, Y., Bockus, W.W., i Dowell, F.E. 2013. Estimation of the Deoxynivalenol and Moisture Contents of Bulk Wheat Grain Samples by FT-NIR Spectroscopy. *Cereal Chemistry* 94: 677–682.
- Peiris, K.H.S., Pumphrey, M.O., Dong, Y., Maghirang, E.B., Berzonsky, W., i Dowell, F.E. 2010. Near-infrared spectroscopic method for identification of Fusarium head blight damage and prediction of deoxynivalenol in single wheat kernels. *Cereal Chemistry* 8: 511–517.
- Peiris, K.H.S., Pumphrey, M.O., i Dowell, F.E. 2009. NIR absorbance characteristics of deoxynivalenol and of sound and fusarium-damaged wheat kernels. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 17: 213–221.
- Pestka, J.J., Lin, W.S., i Miller, E.R. 1987. Emetic activity of the trichothecene 15-acetyldeoxynivalenol in swine. *Food and Chemical Toxicology* 25: 855–858.
- Pestka, J.J. 2007. Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. *Animal Feed Science and Technology* 137: 283–298.
- Pettersson, H., i Åberg, L. 2003. Near infrared spectroscopy for determination of mycotoxins in cereals. *Food Control* 14: 229–232.
- Pleadin, J., Vahčić, N., Perši, N., Ševelj, D., Markov, K., i Frece, J. 2013. Fusarium mycotoxins' occurrence in cereals harvested from Croatian fields. *Food Control* 32: 49–54.
- Rocha, M.D.B., Freire, F.C.O., Maia, F.E.F., Guedes, M.I.F., i Rondina, D. 2014. Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control* 36: 159–65.
- Rodríguez-Carrasco, Y., Ruiz, M.J., Font, G., i Berrada, H. 2013. Exposure estimates to Fusarium mycotoxins through cereals intake. *Chemosphere* 93: 2297–2303.
- Schöneberg, T., Musa, T., Forrer, H.R., Mascher, F., Bucheli, T.D., Bertossa, M., Keller, B., i Vogelgsang, S. 2018. Infection conditions of Fusarium graminearum in barley are variety specific and different from those in wheat. *European Journal of Plant Pathology* 151: 975–989.
- Sforza, S., Dall'Asta, C., i Marchelli, R. 2006. Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 25: 54–76.
- Shahin, M.A., i Symons, S.J. 2012. Detection of fusarium damage in Canadian wheat using visible/near-infrared hyperspectral imaging. *Journal of Food Measurement and Characterization* 6: 3–11.
- Smith, J.E., Solomons, G., Lewis, C., i Anderson, J.G. 1995. Role of mycotoxins in human and animal nutrition and health. *Natural Toxins* 3: 187–192.

- Sobrova, P., Adam, V., Vasatkova, A., Beklova, M., Zeman, L., i Kizek, R. 2010. Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdisciplinary Toxicology* 3: 94–99.
- Sprando, R.L., Collins, T.F.X., Black, T.N., Olejnik, N., Rorie, J.I., Eppley, R.M., i Ruggles, D.I. 2005. Characterization of the effect of deoxynivalenol on selected male reproductive endpoints. *Food and Chemical Toxicology* 43: 623–635.
- Su, P., Guo, X., Fan, Y., Wang, L., Yu, G., Ge, W., Zhao, L., Ma, X., Wu, J., Li, A., Wang, H. i Kong, L. 2018. Application of Brachypodium genotypes to the analysis of type II resistance to Fusarium head blight (FHB). *Plant Science* 272: 255–266.
- Sun, X.-M., Zhang, X.-H., Wang, H.-Y., Cao, W.-J., Yan, X., Zuo, L.-F., Wang, J.-L., i Wang, F.-R. 2002. Effects of sterigmatocystin, deoxynivalenol and aflatoxin G1 on apoptosis of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Biomedical and Environmental Sciences* 15: 145–152.
- Tekle, S., Mage, I., Segtnan, V.H., i Bjornstad, A. 2015. Near-infrared hyperspectral imaging of Fusarium-damaged oats (*Avena sativa* L.). *Cereal Chemistry* 92: 73–80.
- Vidal, A., Morales, H., Sanchis, V., Ramos, A.J., i Marín, S. 2014. Stability of DON and OTA during the breadmaking process and determination of process and performance criteria. *Food Control* 40: 234–242.
- Vidal, A., Sanchis, V., Ramos, A.J., i Marín, S. 2015. Thermal stability and kinetics of degradation of deoxynivalenol, deoxynivalenol conjugates and ochratoxin A during baking of wheat bakery products. *Food Chemistry* 178: 276–286.
- Vidal, A., Sanchis, V., Ramos, A.J., i Marín, S. 2016. The fate of deoxynivalenol through wheat processing to food products. *Current Opinion in Food Science* 11: 34–39.
- Visconti, A., Haidukowski, E.M., Pascale, M., i Silvestri, M. 2004. Reduction of deoxynivalenol during durum wheat processing and spaghetti cooking. *Toxicology Letters* 153: 181–189.
- Wang, L., Luo, Y., Luo, X., Wang, R., Li, Y., Li, Y., Shao, H., i Chen, Z. 2016. Effect of deoxynivalenol detoxification by ozone treatment in wheat grains. *Food Control* 66: 137–144.
- Whitaker, T.B., Hagler, I.W.M., Giesbrecht, F.G., i Johansson, A.S. 2002. Sampling wheat for deoxynivalenol. *Mycotoxins and Food Safety* 504: 73–83.
- Williams, P.J., Geladi, P., Britz, T.J., i Manley, M. 2012. Investigation of fungal development in maize kernels using NIR hyperspectral imaging and multivariate data analysis. *Journal of Cereal Science* 55: 272–278.

7. Annex

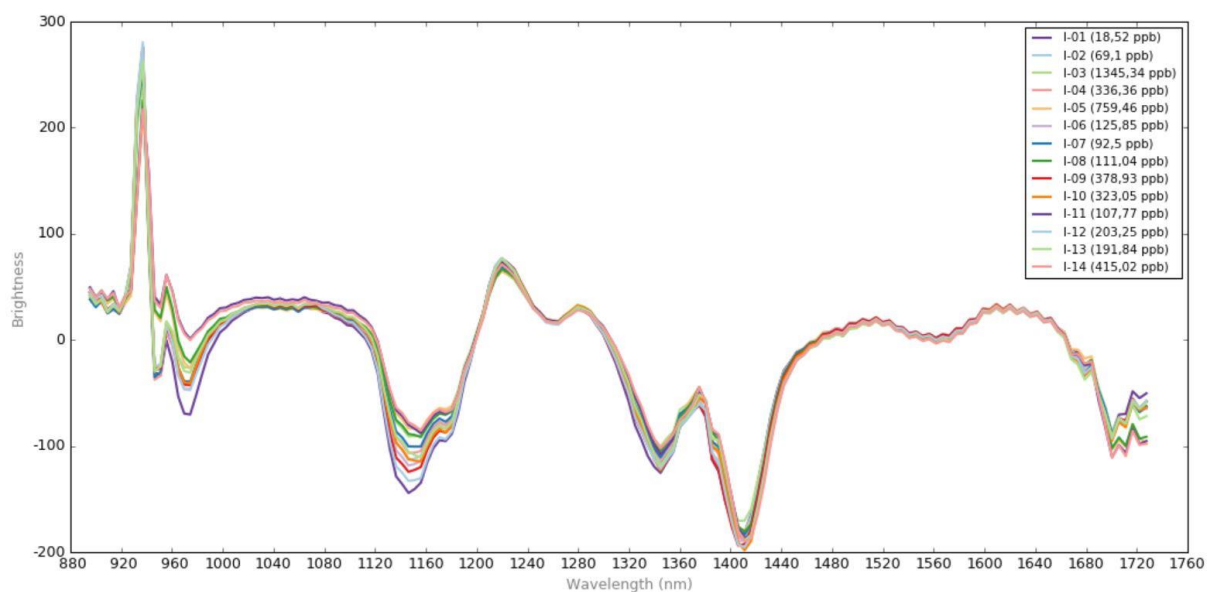


Figura 1. Espectres de les mostres de blat inoculat amb pre-tractament de primera derivada.

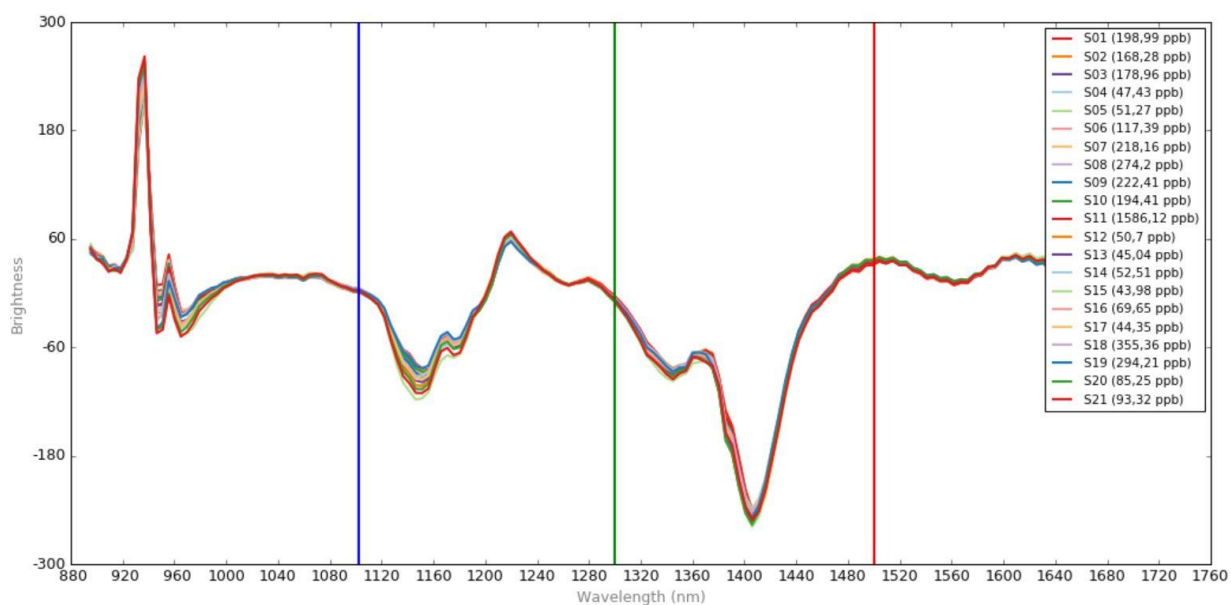


Figura 2. Espectres de les mostres de segó de blat amb pre-tractament de primera derivada.

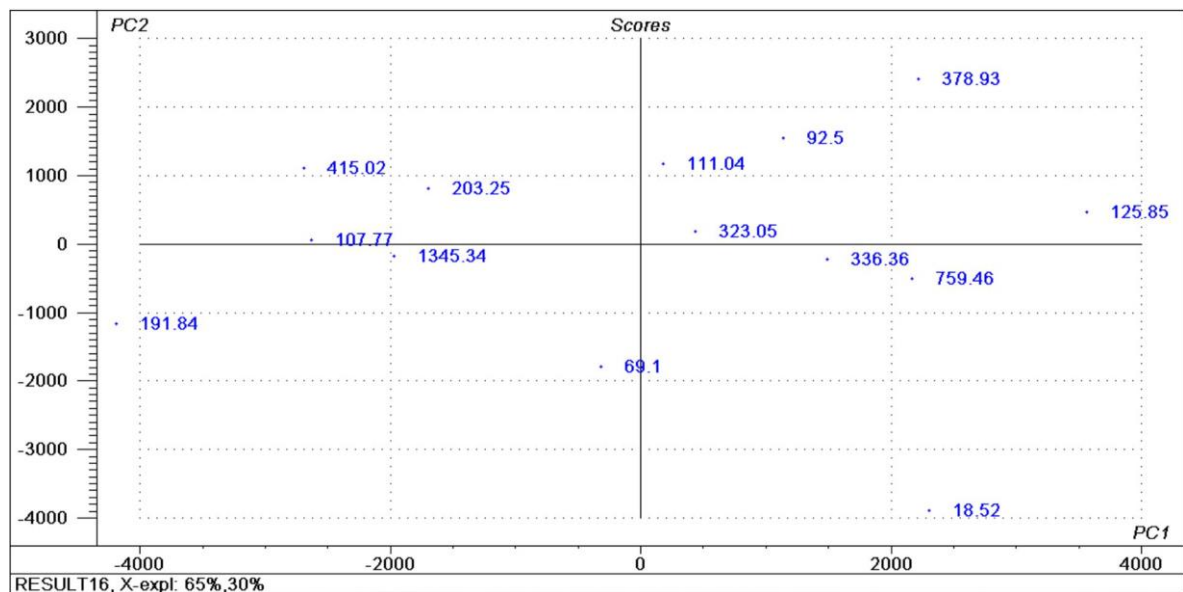


Figura 3. Gràfic PCA de les mostres de blat inoculat

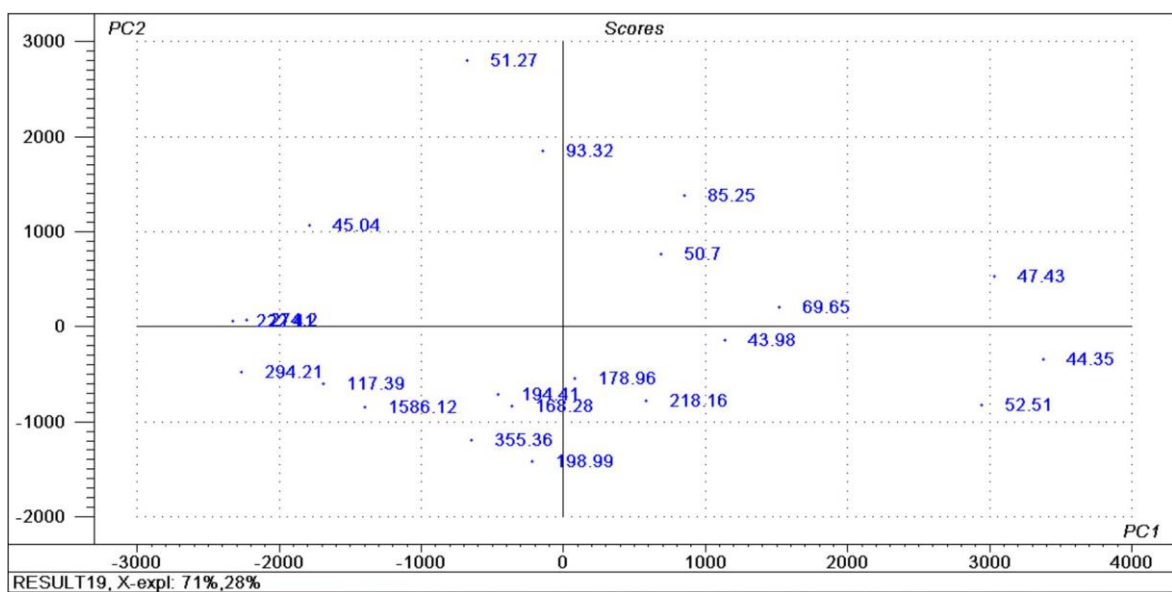


Figura 4. Gràfic PCA de les mostres de segó de blat.

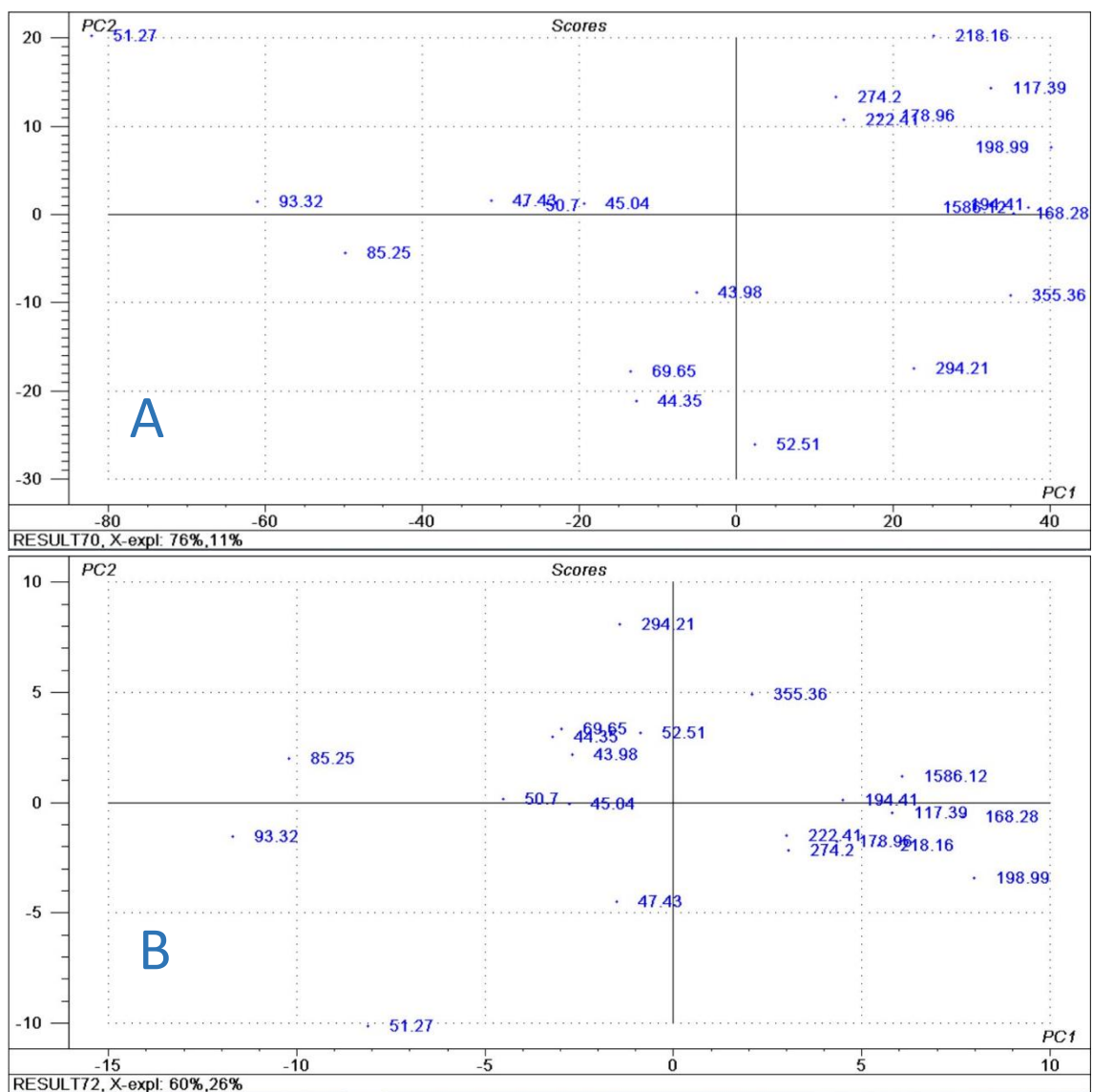


Figura 5. Gràfiques PCA de les dades de segó de blat pretractat amb primera derivada (A) i segona derivada (B)